

**Isolierung und Charakterisierung eines an
Aktinfilamente bindenden Proteins aus
Hühnermägen**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

ELKE SCHRÖER
aus Witten

1987 



**Isolierung und Charakterisierung eines an
Aktinfilamente bindenden Proteins aus
Hühnermägen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
ELKE SCHRÖER
aus Witten

1987

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Wegner

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. G. Snatzke

3. Gutachter: Prof. Dr. K. Wieghardt

Tag der mündlichen Prüfung: 28. April 1988

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. A. Wegner für die Überlassung des Themas, für sein ständiges Interesse und die anregenden Diskussionen während der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. L.M.G. Hellmeyer danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Für ihre wertvolle technische Hilfe danke ich insbesondere Frau E. Werres, sowie Herrn U. Siemen und Frau M. Preiß.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Physiologische Chemie I möchte ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft danken.

Veröffentlichungen

Ein Teil der vorliegenden Ergebnisse ist in den nachstehenden Zeitschriften veröffentlicht worden:

Schröer, E. & Wegner, A. (1985) Eur. J. Biochem. 153, 515-520

Ruhnau, K., Schröer, E. & Wegner, A. (1988) Eur. J. Biochem., im Druck



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	9
2.1.	Präparation von Acetontrockenpulver aus Kaninchenmuskulatur	9
2.2.	Präparation von Aktin aus Acetontrockenpulver	10
2.3.	Modifikation von G-Aktin mit NEM und NBD-Cl	13
2.4.	Präparation von Aktin-Trimeren	14
2.5.	Photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung	16
2.6.	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry	16
2.7.	Gelelektrophorese	16
2.8.	Fluoreszenzmessungen	19
2.9.	Zentrifugationsexperimente	22
2.10.	Enzymatische Verdauung	22
2.11.	Ultrafiltration	23
2.12.	Affinitäts-Chromatographie	24
3.	Resultate	26
3.1.	Präparation des Capping-Proteins aus Hühnermägen	26
3.1.1.	Ionenaustauschchromatographie und Identifizierung	29
3.1.2.	Isolation eines 21 kDa-Peptids durch Gel-filtration	35

3.1.2.1. Ultrafiltration	37
3.1.3. Affinitäts-Chromatographie	38
3.2. Enzymatische Verdauung	41
3.3. Fluoreszenzmessungen	42
3.3.1. Aktin/Capping-Protein-Interaktion	42
3.3.2. Untersuchung des Einflusses des Capping-Proteins auf die Nukleation von Aktin	54
3.3.3. Einfluß des 21 kDa-Peptids auf die Aktin-polymerisation	57
3.3.3.1. Untersuchung der G-Aktin-Abhängigkeit der Interaktion von Aktin und 21 kDa-Peptid	63
3.4. Zentrifugationsexperimente	72
4. Diskussion	75
5. Zusammenfassung	84
6. Literatur	86

Abkürzungen

AA	Acrylamid
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AP	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
HEPES	N(-2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansul- fonsäure
kDa	Kilodalton
LT	Trenngelpuffer
MBA	N,N'-Methylen-bis-acrylamid
NBD-Cl	7-Chloro-4-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazol
NEM	N-Ethylmaleimid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UT	Sammelgelpuffer

1. Einleitung

Aktin ist ein wichtiger Bestandteil eukaryotischer Zellen. Der Anteil des Aktins am Gesamtprotein beträgt in Fibroblasten 8 - 9 % (1,2), im quergestreiften Muskel etwa 16 % (1), in Neuriten 10 - 15 % (1) und in der Amöbe *Acanthamoeba* ungefähr 14 % (3).

Aktin aus Kaninchen-Skelettmuskulatur ist ein globuläres Protein, bestehend aus 375 Aminosäuren und mit einem Molekulargewicht von 42 300 Dalton (4,5). Es besitzt jeweils eine hochaffine Bindungsstelle für ein Nukleotid (ATP oder ADP) und für ein divalentes Kation (5-7). Die Aminosäuresequenz des Skelettmuskel-Aktins unterscheidet sich von den bisher bekannten cytoplasmatischen Aktinen nur in wenigen Positionen (8,9).

Aktin kommt in zwei verschiedenen Formen vor. Monomeres Aktin, das aufgrund seiner globulären Form auch G-Aktin genannt wird, weist eine höhere Affinität zu ATP als zu ADP auf. Unter physiologischen Bedingungen bindet G-Aktin also hauptsächlich ATP. G-Aktin ist nur bei niedrigen Ionenstärken stabil, bei höheren Salzkonzentrationen assoziieren die Monomeren spontan zu langen Filamenten, die als F-Aktin bezeichnet werden. Bei dem Polymerisationsvorgang wird das ATP des G-Aktins mit in das Filament eingebaut. Eine anschließende ATP-Hydrolyse führt zu



ADP-bindenden Filamentuntereinheiten (6,7). Während Aktin in Muskelzellen in Form von Filamenten vorliegt, sind F-Aktin und G-Aktin in den meisten Nicht-Muskel-Zellen im Cytoplasma in ähnlicher Konzentration vorhanden und wandeln sich ständig ineinander um.

Die rechtsgängig, doppelhelikalen Aktinfilamente sind polar. Die beiden Filamentenden unterscheiden sich also in ihrer Struktur. Die Polarität der Filamente wurde elektronenmikroskopisch mit Myosinköpfen (heavy meromyosin, HMM) nachgewiesen. Durch die spitzwinkelige Bindung des HMM an F-Aktin ergibt sich eine pfeilförmige Filamentstruktur mit einem spitzen und einem stumpfen Ende (10, 11). Aufgrund der strukturellen Polarität der Filamente sind die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation von Aktinmonomeren und der Dissoziation von Filamentuntereinheiten an den beiden Enden verschieden (12). Die Anwesenheit von ATP (6,7) bedingt zusätzlich unterschiedliche Gleichgewichtskonstanten und damit eine Differenz der Monomeren-Gleichgewichtskonzentration zwischen stumpfem und spitzem Ende. Am stumpfen Ende mit der höheren Dynamik sind die endständigen Untereinheiten ATP-gebunden, da die Zeit zwischen den einzelnen Assoziationen nicht zur ATP-Hydrolyse ausreicht, während das relativ langsam reagierende spitze Ende ADP-bindende endständige Untereinheiten enthält. Infolgedessen neigt das stumpfe Ende

zur Polymerisation und das spitze Ende zur Depolymerisation. Es stellt sich ein Fließgleichgewicht ein, in dem sich das stumpfe Ende mit derselben Geschwindigkeit verlängert, mit der sich das spitze Ende verkürzt. Dieser Vorgang wurde zunächst 'head-to-tail-polymerization' genannt (13,14), später wurde der Begriff 'treadmilling' eingeführt. Die Treadmilling-Gleichgewichtsmonomerenkonzentration liegt zwischen den Monomeren-Gleichgewichtskonzentrationen der beiden Filamentenden. Voraussetzung für die Aufrechterhaltung des Treadmillings ist die Anwesenheit von ATP und die ATP-Hydrolyse (13). Die Polymerisation von Aktin kann jedoch auch bei Abwesenheit von Nukleotiden ablaufen (15-18).

Die physikalischen und biochemischen Eigenschaften der einzelnen Muskel- und Nicht-Muskel-Aktine unterscheiden sich nur geringfügig voneinander, Nicht-Muskel-Aktin zeigt dasselbe Polymerisationsverhalten wie Aktin aus Kaninchen-Skelettmuskulatur (19-22).

Die Funktion der Aktinfilamente in der Zelle umfaßt sowohl dynamische als auch statische Aufgaben. Die Aktinfilamente ($D = 8 \text{ nm}$) in Muskelzellen sind an der Ausführung gerichteter Bewegung beteiligt. Die als Mikrofilamente bezeichneten Aktinfilamente der Nicht-Muskel-Zellen bilden zusammen mit den Mikrotubuli ($D = 25 \text{ nm}$) und den Intermediärfilamenten ($D = 8 - 10 \text{ nm}$) das Cytoskelett.

Dieses dreidimensionale Netzwerk verleiht der Zelle eine geordnete stabile Struktur.

Während die Mikrofilamente in sich bewegenden Zellen ein polygonales Netzwerk bilden (23), liegen sie in stationären Zellen in Form von Aktinfilamentbündeln vor (24). Diese auch 'stressfibers' genannten, gebündelten Mikrofilamente, vorhanden in Fibroblasten und verschiedenen Epithel- und Endothelzellen (25-28), sind für die Gestalt der Zellen mitverantwortlich. Transformierte Zellen zeigen keine geordnete Filamentstruktur, das G-Aktin/F-Aktin-Verhältnis wird in Richtung G-Aktin verschoben. Neben der veränderten äußeren Zellstruktur wird auch ein abweichendes Verhalten im Zellverbund wie das Fehlen von Kontaktinhibition beobachtet. Revertierte Zellen gewinnen ihre ursprünglichen Fähigkeiten zurück (29,30).

In einigen Nicht-Muskel-Zellen erfüllen Aktinfilamente hochspezialisierte Aufgaben. Sowohl die akrosomalen Fortsätze bei Seeigelspermien als auch die Filamentbündel in den Mikrovilli von Darmepithelzellen bestehen aus Aktinfilamenten, die für die Gestalt der Zellen verantwortlich sind (31,32). Aktin ist direkt beteiligt an der Zellteilung (33,34), amöboiden Zellbewegungen (22,35,36) und bei gerichteten Protoplasmaströmungen in vielen Pflanzenzellen (37,38).

Die indirekte Immunfluoreszenz stellt eine besonders geeignete Methode zum Nachweis von Aktin (24), als auch der Cytoskelett-Bestandteile Mikrotubuli (39) und Intermediärfilamente (40) dar.

Der Auf- und Abbau der Aktinfilamente in der Zelle wird durch eine Vielzahl von Aktin-bindenden Proteinen reguliert. Diese mit Aktin interagierenden Proteine lassen sich aufgrund von stark differierenden regulatorischen Eigenschaften in verschiedene Gruppen einteilen (41). Depolymerisierende Proteine (Profilin, DNase I) binden hochaffin an Aktinmonomere und stabilisieren die G-Aktin-Form. Der Entzug dieser Monomeren aus dem F-Aktin/G-Aktin-Gleichgewicht führt zur Depolymerisation der vorhandenen Filamente (42-48). Ein vielseitiges Protein ist Villin (95 kDa). In Gegenwart von Ca^{2+} reguliert es die Aktinpolymerisation, indem es an das stumpfe Filamentende bindet. Außerdem kann es Ca^{2+} -abhängig Aktinfilamente fragmentieren. In Abwesenheit von Calciumionen vernetzt es die Filamente miteinander (49-52). Eine Quervernetzung der Aktinfilamente bewirkt α -Aktinin (90 kDa) in Nicht-Muskel-Zellen; im quergestreiften Muskel sorgt es für die Aufrechterhaltung eines definierten Abstandes zwischen den Filamenten (53-55). Ein quervernetzendes Protein ist auch Filamin (240 kDa) (56-59). Tropomyosin (mehrere Isoformen) stabilisiert Aktinfilamente, indem es die Fila-

mente vor spontanem Bruch (60) und Fragmentation durch andere Aktin-bindende Proteine bewahrt (60-68).

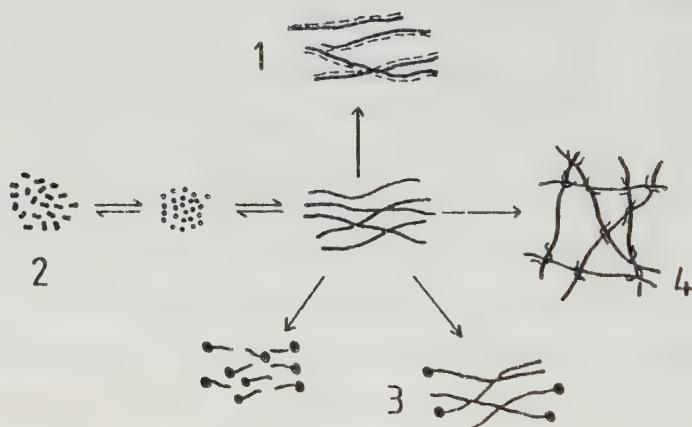


Abb. 1: Schematische Darstellung einiger Regulationsreaktionen Aktin-bindender Proteine.

1: Proteine, die entlang der Filamente binden (z. B. Tropomyosin); 2: Depolymerisierende Proteine (z. B. DNase I); 3: Proteine, die Aktinfilamente fragmentieren und/oder an die Filamentenden binden (z. B. Villin); 4: Quervernetzende Proteine (z. B. α -Aktinin).

Proteine, die an die stumpfen Enden der Aktinfilamente binden oder Aktinfilamente fragmentieren, d. h. regulierend auf das Längenwachstum der Filamente wirken, besitzen in der Regel Nukleus-Eigenschaften (69-72). G-Aktin poly-

merisiert auf diese Proteine auf. Bei nukleierter Polymerisation ist der zeitliche Verlauf der Polymerisation exponentiell, bei nicht nukleierter Aktinpolymerisation hat er ein sigmoides Aussehen (73,74). Die anfängliche lag-Phase basiert auf der relativ langsamen Bildung von Aktin-Nuklei. Die Elongationsgeschwindigkeit wird erst größer als die Dissoziationsgeschwindigkeit, wenn sich mindestens drei G-Aktinmoleküle vereinigt haben (75-78).

Auch Vinculin galt früher als Aktin-bindendes Protein, das an die Aktinfilamentenden bindet. Es wurde angenommen, daß es durch Bindung an das dynamische stumpfe Aktinfilamentende Polymerisation und Depolymerisation an diesem Ende verhindert. Später konnte dann jedoch gezeigt werden, daß es sich bei dem Polymerisations-inhibierenden Protein um eine Verunreinigung handelt, die in rohen Vinculinpräparationen vorkommt und die durch Ionenaustauschchromatographie von Vinculin abgetrennt werden kann (79). Dieses Aktin-bindende Protein wurde nicht in allen Vinculinpräparationen entdeckt (80). Verglichen mit anderen bekannten Proteinen, die an die Enden der Aktinfilamente binden, besitzt es die ungewöhnliche Eigenschaft, nicht als Nukleus bei der Polymerisation von Aktin zu wirken (81).

Gegenstand der vorliegenden Dissertation ist die Isolierung dieses Proteins aus Hühnermägen und seine physikalisch-

chemische Charakterisierung im Hinblick auf die Interaktion mit Aktin.

2. Material und Methoden

2.1. Präparation von Acetontrockenpulver aus Kaninchen- muskulatur

Die Präparation entspricht im wesentlichen der von Szent-Györgyi (82) beschriebenen Methode. Es werden fünf Kaninchen benötigt, die nachfolgend erläuterte Präparation bezieht sich jeweils auf ein Kaninchen.

Durch Injektion von 2,5 ml einer 20 %-igen Evipan-Lösung (Hexobarbital) in die Ohrvene werden die Kaninchen getötet. Die Muskulatur des Rückens und der Gliedmaßen wird freipräpariert und sofort eiskühlt durch einen Fleischwolf gedreht. Der Fleischbrei wird bei 4 °C in 1500 ml Lösung 1 (150 mM KH_2PO_4 , 300 mM KCl, pH 6,5) zehn Minuten gerührt, dabei wird der größte Teil des Myosins extrahiert. Die Suspension wird mit bidestilliertem Wasser auf das 6-fache Volumen verdünnt und anschließend durch dreilagige Gaze filtriert.

Die weiteren Präparationsschritte erfolgen bei Raumtemperatur. Der Aktin-haltige Fleischbrei wird in 3000 ml Lösung 2 (50 mM NaHCO_3) aufgenommen, 30 Minuten gerührt und durch zweilagige Gaze filtriert. Der Rückstand wird nun in 1000 ml Lösung 3 (10 mM NaHCO_3 , 10 mM Na_2CO_3) zehn Minuten gerührt. Die Suspension wird mit gekühltem,

bidestilliertem Wasser auf das 5-fache Volumen verdünnt und sofort durch zweilagige Gaze filtriert. Da unter diesen salzarmen Bedingungen bereits Aktin extrahiert werden kann, wird der Fleischbrei zügig in 1000 ml eisgekühltes Aceton gegeben. Das Aceton muß eisgekühlt vorliegen, denn die negative Mischungsenthalpie der Komponenten Aceton/Wasser führt zu einer Temperaturerhöhung der Suspension. Nach zehnminütigem Rühren wird wieder durch Gaze filtriert und der Vorgang zweimal mit je 500 ml Aceton wiederholt. Der Fleischextrakt ist nun wasser- und weitgehend lipidfrei. Das erhaltene Material wird mehrere Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und ist bei -20°C mehrere Monate haltbar. Die Ausbeute beträgt ca. 40 g Acetontrockenpulver pro Kaninchen.

2.2. Präparation von Aktin aus Acetontrockenpulver

Die Aktinpräparation aus Acetontrockenpulver wird bis auf einige Modifikationen nach der von Rees und Young (83) beschriebenen Methode durchgeführt.

10 g des aus Kaninchenmuskulatur erhaltenen Acetontrockenpulvers werden mit 230 ml Puffer A (0,5 mM ATP, 0,5 mM Ascorbinsäure, 0,2 mM CaCl_2 , 3 mM NaN_3 , mit Tris-HCl auf pH 7,5 eingestellt) 30 Minuten bei 4°C unter Rühren extrahiert. Der Trockenpulverrückstand wird durch Filtration abgetrennt. Das Aktin enthaltende

Filtrat wird 30 Minuten bei 25 000 g zentrifugiert (Rotor 45 Ti) und der klare Überstand mit 0,1-molarer MgCl_2 -Lösung und KCl-Pulver auf eine Ionenkonzentration von 1 mM Mg^{2+} und 100 mM K^+ eingestellt. Unter diesen Salzbedingungen polymerisiert das G-Aktin vollständig zu F-Aktin. Nach 2 Stunden bei Raumtemperatur wird die hochviskose Lösung ultrazentrifugiert (150 Min., 150 000 g, Rotor-Typ 45 Ti). Die Pellets werden mit 100 ml Puffer A aufgenommen und eiskühlt in einem mechanischen Glas-Teflon-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenisat wird in einen Dialyseschlauch gefüllt und 36 Stunden gegen 2 l Puffer A dialysiert, wobei der Puffer nach 18 Stunden gewechselt wird. Während der Dialyse wird das F-Aktin zu G-Aktin depolymerisiert, die nicht depolymerisierten Aktinaggregate werden durch anschließende Zentrifugation (150 Min., 150 000 g, Rotor 45 Ti) abgetrennt. Der G-Aktin-haltige Überstand wird einem zweiten Polymerisations-Depolymerisationszyklus unterworfen.

Je 15-20 ml der letztlich erhaltenen Lösung werden über eine Sephacryl S 200 sf-Säule (400 ml Bettvolumen) chromatographiert. Der Chromatographie-Puffer enthält 0,5 mM ATP, 3mM NaN_3 , 0,2 mM CaCl_2 und 5 mM Triethanolamin/HCl pH 7,5. Die Abbildung 2 zeigt ein typisches Elutionsdiagramm der Aktin-Chromatographie. Die Fraktionen des Peakmaximums werden vereinigt. Man erhält ca. 20 ml

einer Aktin-Lösung mit einer Konzentration von durchschnittlich 30-40 μM .

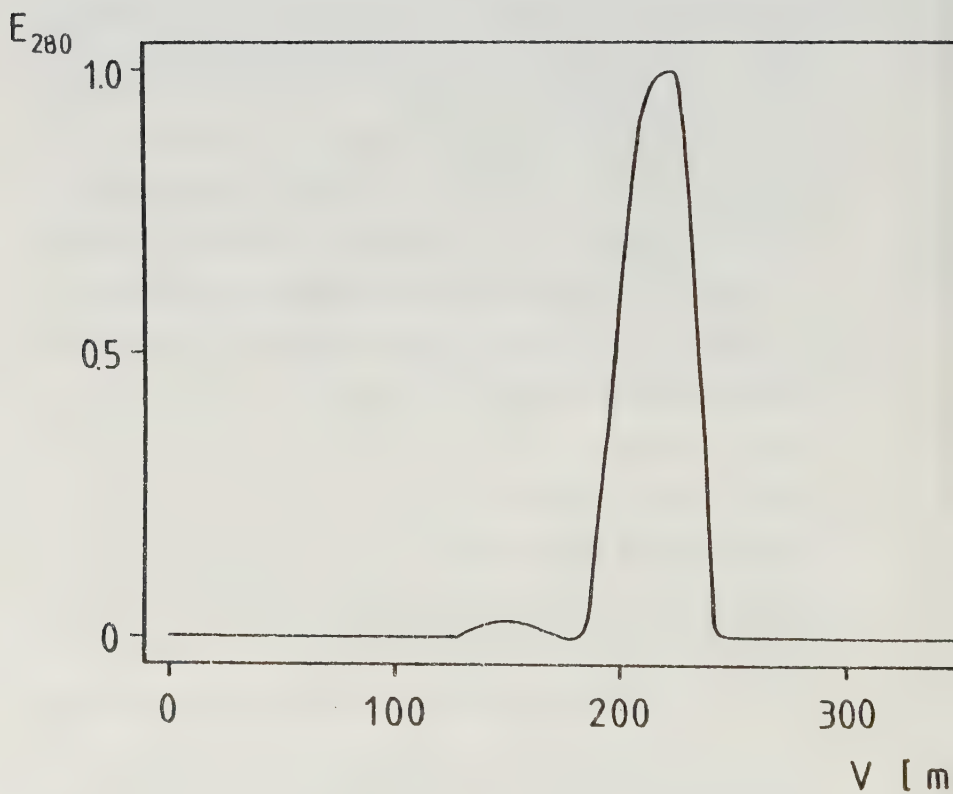


Abb. 2: Gelfiltration von Aktin über eine Sephacryl S 200 sf-Säule. Der Hauptpeak enthält monomeres Aktin, der kleine Nebenpeak enthält oligomeres Aktin.

2.3. Modifikation von G-Aktin mit NEM und NBD-Cl

Die NEM-Markierung des G-Aktins (84) wird nach dem ersten Polymerisations-/Depolymerisationszyklus der Aktinpräparation durchgeführt. Die Modifikation beruht auf einer spezifischen Reaktion des N-Ethylmaleimids (NEM) mit der Sulfhydryl-Gruppe des Cysteins 374 der Aktin-Polypeptidkette (85). Das Aktin-Dialysat wird mit einem 4-fach molaren Überschuß an N-Ethylmaleimid versetzt und eine Stunde bei 20 °C inkubiert. Die Aktinpräparation wird anschließend wie in Kapitel 2.2. beschrieben fortgesetzt.

Liegt eine NEM-Modifikation der Aminosäure Cystein 374 vor, so ist eine gezielte Modifikation des G-Aktins mit 7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3 diazol (NBD-Cl) möglich. Das NBD-Cl bindet unter dieser Voraussetzung spezifisch an die Aminosäure Lysin 373 des Aktins (84). Das NEM-markierte Aktin wird 36 Stunden gegen eine Pufferlösung mit der Zusammensetzung 0,5 mM ATP, 0,2 mM CaCl_2 und 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 dialysiert; der Puffer wird nach 18 Stunden gewechselt. Anschließend wird das Dialysat durch Zugabe von 100 mM KCl und 1 mM MgCl_2 polymerisiert. Nach 45 Minuten pipettiert man zu der F-Aktin-Lösung ein Aliquot einer ethanolischen NBD-Cl-Lösung (20 mM NBD-Cl). Die Reaktion findet bei 16,5 °C in der Dunkelheit statt und wird nach 5 Stunden durch Ultrazentrifugation (150 Min., 150 000 g) beendet. Das

sedimentierte Aktin wird in Puffer A aufgenommen und wie in Kapitel 2.2. beschrieben weiterverarbeitet.

Bei der Modifikation des G-Aktins handelt es sich um eine Markierung des G-Aktins mit einem Fluoreszenzmarker. Das NBD-Cl erweist sich als geeigneter Fluorophor (84) für die Messung der Polymerisationskinetik der Reaktion G-Aktin/F-Aktin mit Hilfe der Fluorimetrie. Die Fluoreszenzintensität des NBD-markierten G-Aktins erhöht sich um den Faktor 2,2 - 2,5 beim Übergang vom monomeren in den polymeren Zustand.

2.4. Präparation von Aktin-Trimeren

Die Präparation von chemisch vernetzten Aktin-Trimeren erfolgte im wesentlichen nach der von Lal et. al. (78) beschriebenen Methode.

Eine nach Kap. 2.2. präparierte G-Aktinlösung wurde über Nacht gegen 3000 ml Puffer B (0,2 mM ATP, 0,1 mM CaCl_2 , 3 mM NaN_3 , 5 mM Tris/HCl pH 8,0) dialysiert; nach der Dialyse wurde photometrisch die Aktinkonzentration bestimmt. Durch Zugabe von Puffer C (5 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 0,2 M KCl, 2 mM MgCl_2 , 0,6 mM ATP, pH 9,3) wurde das G-Aktin zur Polymerisation gebracht, die Volumina an G-Aktinlösung und zugegebener Pufferlösung waren identisch. Nach 4-stündiger Inkubation bei 25 °C war die fluorimetrisch

kontrollierte Polymerisationsreaktion beendet und das Aktin wurde durch Zugabe eines 3-fach molaren Überschusses an NN'-p-Phenylbismaleimid (2 mM in Dimethylformamid) bei 25 °C quervernetzt. Die Reaktion wurde nach 6 Minuten durch Zusatz von β -Mercaptoethanol (320-facher molarer Überschuß bezogen auf NN'-p-Phenylbismaleimid) abgestoppt. Anschließend wurde das quervernetzte Aktin ultrazentrifugiert (2h, 39 000 rpm, 4 °C). Die Pellets wurden in Puffer B resuspendiert und eiskühlt in einem Glas/Teflon-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenisat wurde mehrere Tage bei 4 °C gegen insgesamt 3000 ml Puffer B dialysiert. Nach diesem Depolymerisationsschritt wurden die Monomeren und kleineren Oligomeren durch Zentrifugation (2h, 39 000 rpm, 4 °C) von den größeren quervernetzten Aktinaggregaten abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine Sephadex G-200-Säule (570 ml Bettvolumen) aufgetragen und mit Puffer B eluiert. Andere Gelfiltrationssäulen (Sephacryl S-300, Sepharose Cl 6 B, Fractogel TSK HW-55 (S)) erwiesen sich als ungeeignet, da keine Trennung der Trimeren von den Dimeren erzielt werden konnte. Die Trimeren-haltigen Fraktionen wurden anhand der SDS-Gelelektrophorese ermittelt. Die Konzentrationsbestimmung nach Lowry (86) ergab eine Trimerenkonzentration von ca. 0,15 μ M.

2.5. Photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationen der G-Aktinlösungen wurden photometrisch mit einem Zeiss-Photometer Typ PM QII bestimmt. Der Extinktionskoeffizient beträgt für Aktinmonomere bei einer Wellenlänge von 290 nm $E_{290} = 24\,900 \text{ l/mol cm}$ (13). Für die durch Aminosäuresequenzierung ermittelte Molmasse des Aktins (4) wird ein Wert von 42 300 Da angenommen.

2.6. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Die Proteinkonzentrationen des Capping-Proteins wurden nach der Lowry-Methode (86) mit einem Technicon-Auto-analyzer II bestimmt. Die Eichung der Methode wurde mit BSA-Standards im Kalibrierungsbereich von 50 - 150 µg/ml Protein durchgeführt.

2.7. Gelelektrophorese

Die qualitative Analyse der Präparationen erfolgte mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (87). Die Proteine werden durch SDS denaturiert, indem dieses an die hydrophoben Regionen der Proteine bindet. Die durch das SDS eingeführte stark negative Ladung in die nach Zufall geknäulten denaturierten Polypeptid-Ketten überdeckt die vorhandenen Eigenladungen der Proteine (88).

Bei dieser Methode ist die Beweglichkeit der Proteine im elektrischen Feld eine lineare Funktion der Logarithmen ihrer Molekulargewichte (89), d.h. die SDS-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung eines Proteingemisches nach Molekulargewichten sowie die Bestimmung des Molekulargewichtes eines Proteins.

Tab. 1: Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

Trenngel (40 ml)

	H ₂ O	LT	AA-Stock	AP	TEMED
7 %	20,5	10,0	9,1	0,4	0,01
10 %	16,6	10,0	13,0	0,4	0,01
12 %	14,0	10,0	15,6	0,4	0,01
16 %	8,8	10,0	20,8	0,4	0,01

Sammelgel (10 ml)

	H ₂ O	UT	AA-Stock	AP	TEMED
4 %	6,2	2,5	1,3	0,03	0,01

LT (4x): 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,4 % SDS

UT (4x): 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,4 % SDS

AA-Stock: 75 g Acrylamid, 2,0 g MBA ad 250 ml

Probenpuffer nach Laemmli (87)

Aufgrund der guten Vergleichsmöglichkeit verschiedener aufgetrennter Proben wurden ausschließlich Plattengele verwendet. Die Zusammensetzung des Trenngels wurde der jeweiligen Problemstellung angepaßt (s. Tab. 1). Ein

Proteingemisch bekannter Zusammensetzung der Firma Pharmacia diente als Molekulargewichtsmarker (Phosphorylase b MW 94 000, BSA MW 67 000, Ovalbumin MW 43 000, Carbonic Anhydrase MW 30 000, Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor MW 20 100, α -Lactalbumin MW 14 400). Die Proteinbanden wurden mit dem organischen Farbstoff "Coomassie Blue" (2,5 g Serva Blau, 454 ml Methanol, 92 ml Essigsäure, 454 ml H₂O dest.) eine Stunde bei Raumtemperatur angefärbt und fixiert. Der Farbstoffüberschuß wurde durch mehrmaliges Waschen des Gels mit Entfärber (20 Volumenprozent Methanol, 10 Volumenprozent Essigsäure) entfernt.

Eine spezielle Färbetechnik wurde angewandt für die Separation von Proteinen durch Elution aus Proteinbanden. Zu diesem Zweck wurden die Proteinbanden mit einer 0,25 % KCl enthaltenden Lösung bei 4 °C in einem Zeitraum von 5 Minuten angefärbt (90), überschüssiges Kaliumchlorid wurde durch mehrstündiges Waschen mit H₂O bidest. (4 °C) entfernt. Auf diese Weise können Proteine entweder durch Diffusion aus den zermahlenen Gelstücken in einem geeigneten Extraktionspuffer (0,1 % SDS, 50 mM NH₄HCO₃) oder durch Elektroelution (90,91) schonend zurückgewonnen werden.

2.8. Fluoreszenzmessungen

Die Fluoreszenzmessungen basierten auf Fluoreszenzänderungen. Beim Übergang des NBD-Aktins vom monomeren in den polymeren Zustand wird eine 2,2- bis 2,5-fache Änderung der Fluoreszenzintensität beobachtet (84). In einem System, in dem beide Zustände nebeneinander vorliegen, setzt sich die Fluoreszenzintensität ($I_{\text{ges.}}$) aus der Summe der Einzelintensitäten zusammen, wobei ein direkter Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzintensität und der Konzentration des NBD-Aktins in den verschiedenen Zuständen besteht.

$$I_{\text{ges.}} = i_1 \cdot c_1 + i_f \cdot c_f$$

c_1 : G-Aktin-Konzentration

c_f : F-Aktin-Konzentration (Untereinheiten von polymerem Aktin)

i_1, i_f : relative molare Fluoreszenzintensitäten

$$(i_f/i_1 = 2,2 - 2,5)$$

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit Aktin-Lösungen, die zu 10 Volumenprozent mit NBD-Aktin versetzt waren, durchgeführt. Die benötigten G-Aktin-Lösungen wurden durch Verdünnung der G-Aktin-Stammlösungen mit ATP-Dialysepuffer (s. Tab. 2) erhalten, die F-Aktin-Lösungen wurden hergestellt durch Verdünnung der G-Aktin-Stammlösungen

mit ATP-Dialysepuffer, Zugabe von MgCl_2 (Ionenendkonzentration 2 mM) und Inkubation bei 37 °C. In den Meßküvetten wurde bei dem größten Teil der Messungen eine G-Aktinkonzentration von 2,0 μM und eine F-Aktinkonzentration von 0,5 μM vorgegeben. Der Gehalt an Capping-Protein variierte bei den einzelnen Meßreihen. Die Capping-Protein-Lösungen wurden für die fluorimetrischen Untersuchungen der Aktin/Capping-Protein-Interaktion gegen Dialysepuffer (Tab. 2) dialysiert. Die Polymerisation des G-Aktins wurde anhand der Änderung der Fluoreszenzintensität verfolgt, die Meßwerte wurden in zweiminütigem Abstand registriert. Das Ende der Polymerisationsreaktion wurde durch zeitlich konstante Meßwerte angezeigt. Kalibriert wurden die Messungen mit Aktinstandardlösungen.

Tab. 2: Puffersysteme für Fluoreszenzmessungen

<u>Dialysepuffer:</u>	Test-Lösungen (10 ml)
10 μM MgCl_2 , 3 mM NaN_3	I 0,87 ml 0,1 M MgCl_2
5 mM Triethanolamin	0,64 ml 25 mM ATP
pH 7,5	8,49 ml Dialysepuffer
<u>ATP-Dialysepuffer:</u>	II 0,87 ml 0,1 M MgCl_2
10 μM MgCl_2 , 3mM NaN_3	4,35 ml 1 M KCl
0,5 mM ATP	0,64 ml 25 mM ATP
5 mM Triethanolamin	4,14 ml Dialysepuffer
pH 7,5	
<u>Chromatographie-Puffer:</u>	
0,2 mM CaCl_2 , 3 mM NaN_3	
0,5 mM ATP	
5 mM Triethanolamin	

Die Fluoreszenzmessungen wurden entweder mit einem Perkin-Elmer LS-3 Fluorimeter oder mit einem 'Jobin Yvon' Spektrofluorimeter JY 3D durchgeführt. Das Perkin-Elmer-Gerät ist mit einer Netzfrequenz-gepulsten Xenon-Entladungslampe (8,3 W) ausgerüstet, das Jobin Yvon-Gerät verfügt über eine Xenon-Quecksilber-Lampe mit 200 W Leistung.

Die Wellenlängenselektion erfolgte über einen Anregungs- und einen Emissionsmonochromator, die Anregungswellenlänge des NBD-G-Aktins beträgt 436 nm, die Emissionswellenlänge 530 nm. Aufgrund der großen Differenz zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge waren Streulichteffekte vernachlässigbar klein. Die Spaltbreite wurde auf 10 nm eingestellt, um möglichst große Fluoreszenzsignale zu erhalten, die über einen Photomultiplier verstärkt und digital angezeigt wurden. Die zeitabhängige Registrierung der Fluoreszenzsignale erfolgte in der Regel mit Hilfe eines Schreibers (Servocorder SR 6254). Für die Messungen wurden Quarzglas-Küvetten mit einem Fassungsvermögen von 0,6 ml, 0,8 ml und 2,4 ml der Firma Hellma verwendet. Die Thermostatisierung des sich im Probenraum des Fluorimeters befindenden Küvettenhalters sowie des heizbaren Küvettenblocks wurde bei den Messungen mit dem Perkin-Elmer-Gerät mit einem Lauda-Compact-Kältethermostaten Typ RC S6 (Temperaturbereich -30 - +150 °C) durchgeführt. Bei der Benutzung des Jobin-Yvon-Fluorimeters erfolgte die Thermostatisierung mit einem Thermostaten der Firma Haake

(Typ F3/C). Der aus Kupfer bestehende Küvettenblock diente zur Temperierung der Küvetten und der für die Messungen benötigten Lösungen. Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt.

2.9. Zentrifugationsexperimente

Das Bindungsverhalten des Capping-Proteins bezüglich der Aktinfilamente wurde ergänzend zu den Fluoreszenzmessungen mit Hilfe von Zentrifugationsexperimenten untersucht. Dazu wurden Aktin- und Capping-Protein-Lösung vereinigt (experimentelle Bedingungen: 20 °C, 2 mM $MgCl_2$), der sich einstellende Gleichgewichtszustand wurde fluorimetrisch kontrolliert. Der Capping-Protein/F-Aktin-Komplex wurde anschließend aus der Lösung abzentrifugiert (40 000 rpm, 1 h) und Überstand und Sediment jeweils getrennt elektrophoretisch und fluorimetrisch untersucht.

2.10. Enzymatische Verdauung

Die enzymatische Verdauung wurde mit Trypsin aus Rinderpankreas, E.C. 3.4.21.4. (spezifische Aktivität 110 U/mg Lyophilisat), der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt. 500 µl einer Capping-Protein-Lösung wurden mit 500 µl Trypsin-Lösung (1 mg Trypsin/ml Pufferlösung) versetzt und 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Pufferlösung ent-

hielt 10 μM MgCl_2 , 3 mM NaN_3 und 5 mM Triethanolamin/HCl pH 7,5. Die Proteolyse wurde durch Zugabe eines 5-fach molaren Überschusses an Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (Fa. Boehringer Mannheim) gestoppt. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde wurde die so behandelte Capping-Protein-Lösung fluorimetrisch untersucht.

2.11. Ultrafiltration

Das Ultrafiltrationsverfahren wurde zur Fraktionierung und Konzentrierung von Proteinlösungen angewandt. Die Fraktionierung der Proteinlösung nach unterschiedlicher Molekülgröße wurde unter Verwendung einer PM 30-Membran mit einer Ultrafiltrationszelle (Modell 8050, 50 ml Fassungsvermögen) der Firma Amicon durchgeführt. Das Ultrafiltrat der PM 30-Membran wurde mit Hilfe eines Amicon- Mikro-Ultrafiltrationssystems (Modell BMC, 8 ml Fassungsvermögen) über eine YM 10-Membran ankonzentriert. Mit einer Stickstoff-Druckflasche wurde sowohl bei der Fraktionierung als auch bei der Konzentrierung ein Druck von 3,5 bar auf der Oberfläche der Proteinlösung erzeugt.

2.12. Affinitäts-Chromatographie

Es wurde versucht, das Capping-Protein unter Ausnutzung seiner Aktin-bindenden Fähigkeit mittels Affinitäts-Chromatographie zu reinigen (s. Kap. 3.1.3.).

DNase I-Agarose-Affinitätssäule:

Zunächst wurde an ein Agarose-Gel, Affi Gel 10 von Bio-Rad, DNase I kovalent gebunden (1 mg DNase I/ml Gel; Kopplungspuffer: 0,1 mM CaCl_2 , 0,1 M HEPES/KOH pH 7,5). Nach Knüpfung der Bindung wurden die nicht abreagierten aktiven Ester des Agarose-Gels mit Ethanolin/HCl pH 8,0 (0,1 ml 1 M-Lösung/ml Gel) blockiert und das Gel anschließend solange gewaschen, bis es frei von Reaktanden war. Die auf diese Weise erhaltene Affinitätssäule wurde mit monomerem Aktin gesättigt (Puffersystem: 0,5 mM ATP, 3 mM NaN_3 , 0,2 mM CaCl_2 , 5 mM Triethanolamin/HCl pH 7,5); G-Aktin wird nichtkovalent an die DNase I gebunden (47). Die Säule wurde nun mit einer Pufferlösung äquilibriert, die 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 0,1 mM ATP und 2 mM HEPES/KOH (pH 7,2) enthielt. Anschließend wurde gegen diese Pufferlösung dialysierter Capping-Protein-Extrakt auf die Affinitätssäule aufgetragen. Da das Capping-Protein jedoch nicht an die Aktinmonomeren der Säule adsorbiert wurde, sollten chemisch vernetzte Aktin-Trimere (s. Kap. 2.4.) an die DNase I einer Affinitätssäule fixiert werden, um die Wechselwirkung des Capping-Proteins mit Aktinfilamenten auszunutzen.

Hinsichtlich ihres Polymerisationsverhaltens besitzen Aktin-Trimere die Eigenschaften von Aktinfilamenten (75). Es stellte sich jedoch heraus, daß Aktin-Trimere nicht an die DNase I der Affinitätssäule binden.

Aktin-Trimere - Agarose - Affinitätssäule:

Chemisch vernetzte Aktin-Trimere wurden nun direkt an das Agarose-Gel Affi Gel 15 von Bio-Rad gekoppelt (Puffersystem: 0,1 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES/KOH pH 8,0). Anschließend wurde die so erhaltene Affinitätssäule mit einer Pufferlösung äquilibriert, die 2 mM MgCl_2 , 0,5 mM ATP, 0,1 mM CaCl_2 , 3 mM NaN_3 und 5 mM Triethanolamin/HCl (pH 7,5) enthielt. Danach wurde die gegen diesen Puffer dialysierte Capping-Protein-haltige Lösung auf die Affinitätssäule aufgetragen und anhand fluorimetrischer Untersuchungen des Eluats der Reinigungseffekt der Säule untersucht.

3. Resultate

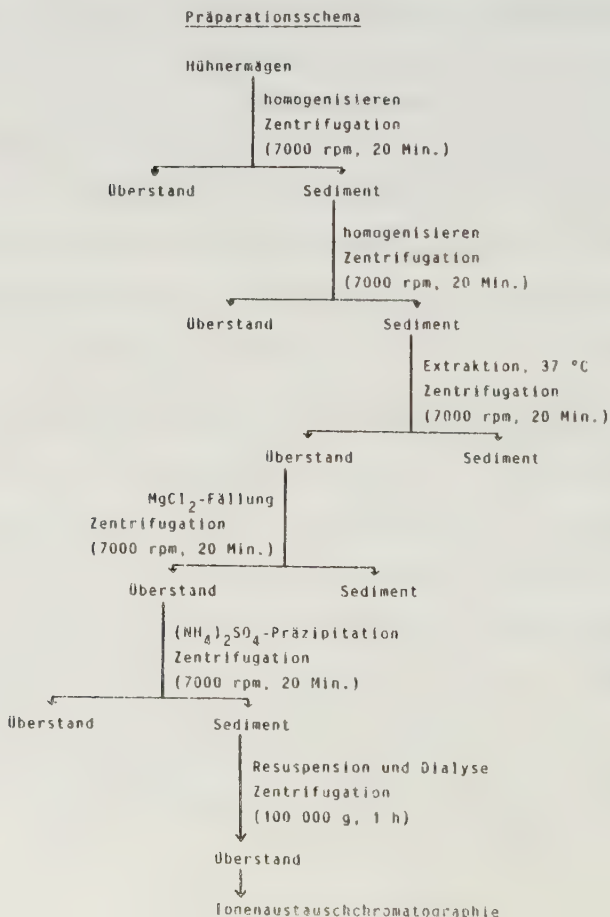
3.1. Präparation des Capping-Proteins aus Hühnermägen

Vinculin wurde früher für ein Aktin-bindendes Protein gehalten, das an die Enden der Aktinfilamente bindet. Evans und Mitarbeiter (79) konnten jedoch zeigen, daß nicht Vinculin das Aktin-bindende Protein ist, sondern ein Protein, das als Verunreinigung in rohen Vinculinpräparationen vorkommt und durch Carboxymethylzellulose-Chromatographie von Vinculin abgetrennt werden kann. In dieser Arbeit wird eine Präparationsmethode zur Isolierung dieses Aktin-bindenden Proteins aus Hühnermägen beschrieben. Im folgenden wird dieses Protein 'Capping-Protein' genannt. Die ersten Reinigungsschritte erfolgten nach dem in einigen Punkten modifizierten Verfahren von Feramisco und Burridge (92).

Als Ausgangsmaterial wurden tiefgefrorene Hühnermägen der Firma Karstadt eingesetzt. Das Fett- und Bindegewebe wurde mit Hilfe eines Skalpells quantitativ von dem Muskelfleisch der gefrorenen Hühnermägen entfernt; für jede Präparation wurden 300 g Muskelfleisch benötigt. Das gefrorene Material wurde mit bidestilliertem, 0,5 mM PMSF enthaltendem Wasser (3000 ml/300 g Muskelfleisch) versetzt und bei 4 °C in einem Mixer (Typ 'Waring Blender') 3 x 10 Sekunden homogenisiert. Das Homogenisat wurde nun

20 Minuten zentrifugiert (7000 rpm, 4 °C); die Sedimente wurden in dem 10-fachen Volumen an Wasser + 0,5 mM PMSF resuspendiert und 10 Sekunden in einem Mixer homogenisiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Sedimente in 3000 ml Extraktionspuffer (2 mM Tris, 1 mM EGTA, 0,5 mM PMSF, pH 9,0) aufgenommen. Die Suspension wurde in einem thermostatisierten Wasserbad auf 37 °C erwärmt und 30 Minuten bei dieser Temperatur gerührt. Der Fleischbrei wurde nach beendeter Extraktion durch Zentrifugation sedimentiert. Die Zentrifugationsüberstände wurden vereinigt, auf Raumtemperatur erwärmt und mit Essigsäure (0,5 M) auf pH 7,1 eingestellt. Zur Abtrennung bisher mitgereinigter unerwünschter Proteine wurde eine MgCl_2 -Fällung durchgeführt. Durch portionsweise Zugabe einer 1-molaren MgCl_2 -Lösung wurde eine MgCl_2 -Konzentration des Überstandes von 10 mM erzeugt. Die Lösung wurde während der Fällung und weitere 15 Minuten nach der Fällung bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das ausgefällte Protein abzentrifugiert und der klare Zentrifugationsüberstand auf 4 °C abgekühlt. Es folgte eine zweistufige Ammoniumsulfat-Präzipitation, zunächst wurden 14,9 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/100\text{ml}$ Überstand portionsweise unter Rühren zugegeben. Nach beendetem ersten Fällungsschritt wurde die Lösung zur vollständigen Einstellung des Gleichgewichts noch 20 Minuten gerührt. Im zweiten Schritt der Ammoniumsulfat-Präzipitation wurden 5,6 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/100\text{ ml}$ Überstand eingesetzt.

die Zugabe erfolgte ebenfalls in kleinen Portionen. Anschließend wurde das präzipitierte Protein abzentrifugiert. Die erhaltenen Sedimente wurden in 70 - 100 ml Puffer I (5mM NaCl, 0,25 mM EDTA, 10 mM Mercaptoethanol, 5 mM Tris/ CH_3COOH pH 7,6) resuspendiert und über Nacht gegen diesen Puffer dialysiert. Im Dialysat befanden sich neben dem Capping-Protein weitere Proteine wie α -Aktinin, Filamin und Vinculin.



3.1.1. Ionenaustauschchromatographie und -Identifizierung

Die Proteinlösung wurde nach der Dialyse 1 Stunde mit 100 000 g zentrifugiert (Beckmann L3-40, Rotor-Typ 45 Ti) und anschließend auf eine DEAE-Zellulose-Anionenaustauschersäule (D = 2,5 cm, L = 30 cm, ca. 150 ml Bettvolumen), äquilibriert mit Puffer I, aufgetragen. Die chromatographische Trennung des Proteingemisches erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten (5 - 500 mM NaCl in Puffer I, 2000 ml Puffervolumen). Bei einer Flußgeschwindigkeit von 65 ml/h wurden Fraktionen mit einem Fraktionsvolumina von 12 ml gesammelt.

Das Capping-Protein wurde im NaCl-Konzentrationsbereich von 20 - 100 mM NaCl eluiert (Abb. 3). Die Capping-Aktivität wurde fluorimetrisch untersucht; die Aktivitätstests erfolgten über die Messung der nukleierten Aktinpolymerisation, die bei Anwesenheit von Capping-Protein verlangsamt oder verhindert wurde. Die Polymerisation des Aktins wurde durch die Zunahme der Fluoreszenzintensität verfolgt (s. Kap. 2.9.). Die quantitative Capping-Aktivität r (Abb. 3) wurde nach $r = (t_i - t_a)/t_i$ berechnet, dabei entspricht t_a der Halbwertszeit der Fluoreszenzintensitätszunahme in Abwesenheit von Capping-Protein und t_i der Halbwertszeit der Fluoreszenzintensitätszunahme in Gegenwart von Capping-Protein. Die

Abbildung 3 zeigt außerdem ein typisches Elutionsdiagramm der DEAE-Zellulose-Chromatographie, die Fraktionen unter dem zweiten Peak enthalten Vinculin.

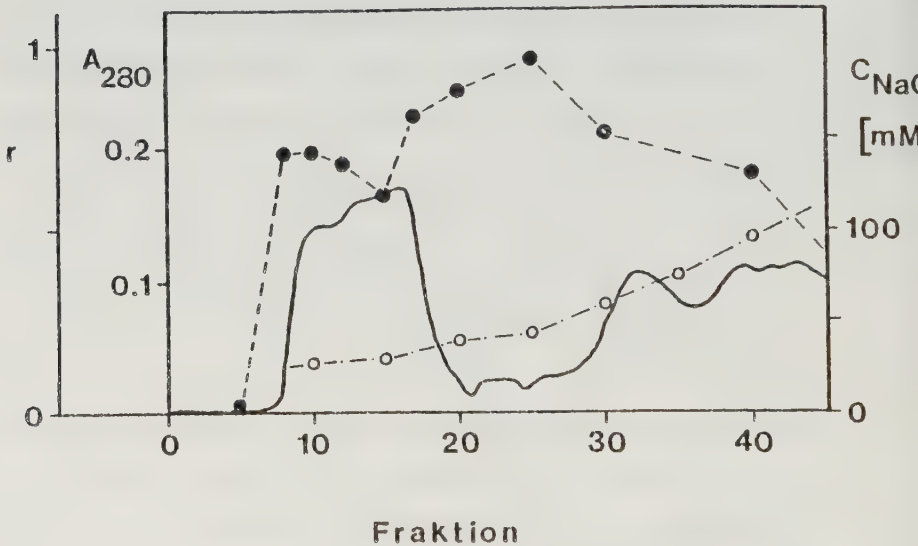


Abb. 3: Elutionsprofil der DEAE-Zellulose-Chromatographie. (—) UV-Absorption bei 280 nm; (o---o) NaCl-Konzentration C_{NaCl} ; (●---●) anhand von Fluoreszenzmessungen berechnete Capping-Aktivität r von 0,5 ml Capping-Protein-Lösung (Gesamtvolumen der Meßküvette: 2 ml, exp. Bedingungen: 2 μ M G-Aktin, 0,5 μ M F-Aktin, 2 mM $MgCl_2$, 37 °C).

Die Fraktionen, die vor dem Vinculin von der Säule eluiert wurden und Capping-Aktivität enthielten, wurden vereinigt und 16 h gegen Puffer I dialysiert. Zur Konzentrierung der Proteinlösung wurde das Dialysat (ca. 150 ml) auf eine DEAE-Sepharose-Cl 6B-Anionenaustauschersäule (D = 1,5 cm, L = 15 cm, 26 ml Bettvolumen) aufgetragen. Die Proteinelution erfolgte mit 200 mM NaCl in Puffer I, auf diese Weise wurden 8 ml einer konzentrierten Proteinlösung erhalten.

Die qualitative Beurteilung dieser Proteinlösung erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (s. Kap. 2.7.). Die SDS-Polyacrylamidgele enthielten stets zahlreiche Banden im Molekulargewichts-Bereich von 14 kDa bis 100 kDa; die Molekulargewichtszuordnung wurde anhand von Proteinstandards durchgeführt. Um die Lage der Banden des Capping-Proteins auf dem Gel zu lokalisieren, wurden die SDS-Gele mit 0,25 M KCL-Lösung gefärbt, einzelne Banden ausgeschnitten und eluiert (s. Kap. 2.7.). Anschließend wurde fluorimetrisch die Capping-Aktivität der eluierten Banden untersucht. Es stellte sich heraus, daß das Capping-Protein hinsichtlich des Molekulargewichtes heterogen ist, im Molekulargewichts-Bereich von 20 kDa bis 80 kDa wurde Capping-Aktivität gefunden (Abb. 4).

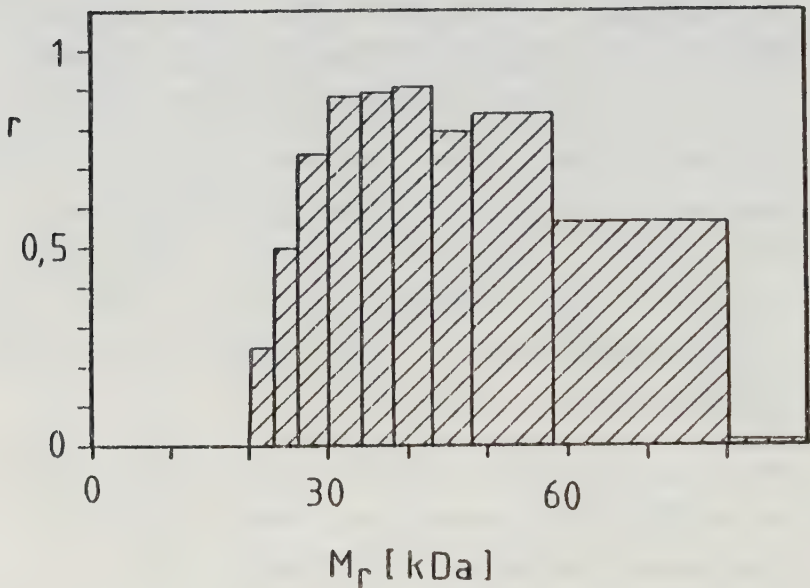


Abb. 4: Verteilung des Capping-Proteins über das Molekulargewicht M_r . Die Molekulargewichtszuordnung erfolgte elektrophoretisch anhand von Proteinstandards. r = Capping-Aktivität der eluierten Banden (0,4 ml Eluat) in Gegenwart von 2 μ M G-Aktin, 0,5 μ M F-Aktin und 2 mM $MgCl_2$; Gesamtvolumen: 0,8 ml.

Eine zweite ausgearbeitete Reinigungsmethode basiert auf dem von Evans et al. (79) beschriebenen Verfahren zur Isolierung von Vinculin.

Zunächst wurden die Capping-Aktivität enthaltenden Fraktionen der DEAE-Zellulose-Chromatographie vereinigt. Die Proteinlösung wurde mit Essigsäure (0,5 M) auf pH 5,3 gebracht und 24 h gegen insgesamt 8000 ml Puffer II (5 mM NaCl, 0,25 mM EDTA, 5 mM Na-Acetat, 10 mM Mercaptoethanol, pH 5,0) dialysiert. Es folgte eine chromatographische Separation der Proteinlösung über eine Kationenaustauschersäule (Fractogel TSK CM-650(S), D = 2,5 cm, L = 15 cm, 75 ml Bettvolumen) unter Verwendung eines linearen NaCl-Gradienten (5 - 500 mM NaCl in Puffer II, 2000 ml Puffervolumen). Das Capping-Protein wurde im NaCl-Konzentrationsbereich von 125 - 200 mM NaCl eluiert (Abb. 5). Die Fraktionen mit Capping-Aktivität wurden vereinigt, die Proteinlösung über Nacht gegen Puffer II dialysiert und durch erneute Chromatographie über die Kationenaustauschersäule mit 300 mM NaCl enthaltendem Puffer II konzentriert.

Diese Reinigungsmethode besitzt gegenüber der oben beschriebenen den Nachteil, daß das Protein aufgrund der relativ langen Verweilzeit in saurem Milieu (pH 5,0) unbeständiger ist. Die Capping-Aktivität nimmt mit einer Halbwertszeit von einigen Tagen ab.

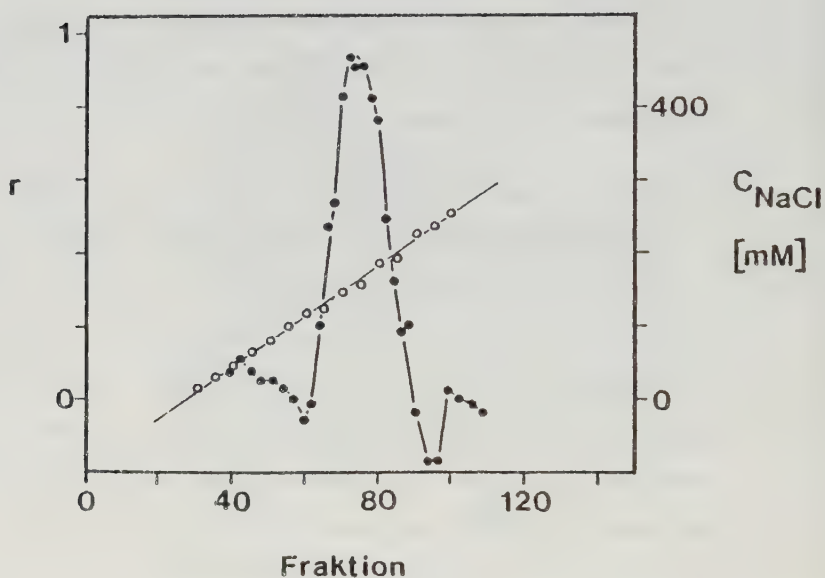


Abb. 5: Elutionsprofil der Carboxy-Vinylpolymer-Chromatographie (TSK CM-650(S)).
(o-o) NaCl-Konzentration C_{NaCl}
(●-●) Capping-Aktivität r von 0,1 ml Capping-Protein-Lösung in Gegenwart von 2 μ M G-Aktin, 0,5 μ M F-Aktin und 2 mM $MgCl_2$, Gesamtvolumen: 2 ml.

3.1.2. Isolation eines 21 kDa-Peptids durch Gelfiltration

Die SDS-Polyacrylamidgele der Capping-Protein-haltigen Fraktionen der Säulenläufe enthielten stets viele Banden (Abb.6, Spalte '2'), deren Intensität von Präparation zu Präparation variierte. Anhand zahlreich durchgeführter Präparationen wurde jedoch festgestellt, daß die Gele regelmäßig eine intensive 21 kDa-Bande enthielten. Die fluorimetrischen Messungen hinsichtlich der Capping-Aktivität der eluierten Banden zeigten, daß das Capping-Protein über einen Molekulargewichts-Bereich von 20 kDa bis 80 kDa auf dem Gel verteilt war. Die Fluoreszenzmessungen gaben aber keinen Aufschluß darüber, ob in diesem Molekulargewichts-Bereich alle Banden dem Capping-Protein zugeordnet werden konnten. Diese Frage wurde deshalb mit Hilfe von Zentrifugationsexperimenten geklärt. Dazu wurden Aktin- und Capping-Protein-Lösung vereinigt und bei 20 °C inkubiert (exp. Bedingung: 2 mM $MgCl_2$). Der Capping-Protein/F-Aktin-Komplex wurde nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes durch Zentrifugation (40 000 rpm, 1 h) sedimentiert. Die Analyse des Sedimentes erfolgte elektrophoretisch, das Ergebnis ist in Abb. 6, Spalte '3' dargestellt. Die Abbildung zeigt eine intensive Aktinbande und die mit den Aktinfilamenten cosedimentierten Peptide des Capping-Proteins. In Übereinstimmung zu den Fluoreszenzmessungen liegen die Molekulargewichte dieser Peptide im Bereich von 21 kDa bis etwa 85 kDa.

Das 21 kDa-Peptid konnte anhand der Zentrifugationsexperimente eindeutig dem Capping-Protein zugeordnet werden. Zur Isolierung des aktiven 21 kDa-Peptids wurde die konzentrierte Proteinlösung der DEAE-Sepharose Cl 6B-Chromatographie 16 Stunden gegen Puffer III (10 μ M $MgCl_2$, 20 mM NaCl, 3 mM NaN_3 , 5 mM Triethanolamin/HCl pH 7,5) dialysiert und das Dialysat auf eine Gelfiltrationssäule (Sepharose Cl 6B, D = 1,5 cm, L = 100 cm, 176 ml Bettvolumen), äquilibriert mit Puffer III, aufgetragen. Das 21 kDa-Peptid wurde bei einem Puffervolumen von ungefähr 150 ml eluiert. Die Identifizierung des 21 kDa-Peptids erfolgte mit SDS-Polyacrylamidgelen (Abb. 6, Spalte '4'), Die Capping-Aktivität wurde fluorimetrisch kontrolliert.

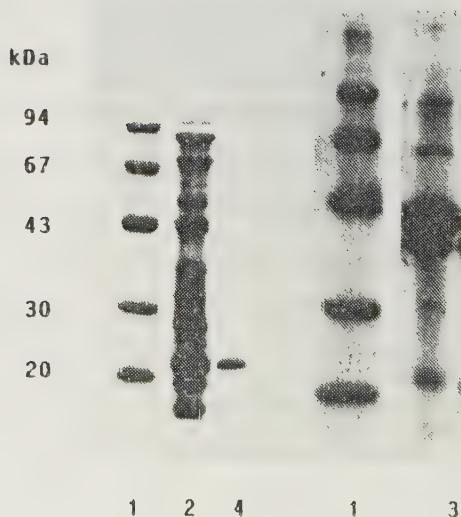


Abb. 6

3.1.2.1. Ultrafiltration

Eine schnelle Reinigung des 21 kDa-Peptids war auch mit Hilfe der Ultrafiltration realisierbar. Die Capping-Protein-Lösung der DEAE-Sephrose-Chromatographie wurde in einer Amicon-Druckkammer über eine PM 30-Membran filtriert. Das 21 kDa-Peptid konnte die Membran passieren, während die höhermolekularen Peptide von der Membran zurückgehalten wurden. Die Konzentrierung der 21 kDa-Peptid-Lösung erfolgte anschließend mittels einer YM 10-Ultrafiltrationsmembran.

Die Druckbehandlung führte leider zur Inaktivierung des 21 kDa-Peptids, Aktin-Bindungsstudien konnten deshalb mit dem so gereinigten Peptid nicht durchgeführt werden.

Abb. 6: SDS-Gelelektrophorese.

- (1) Molekulargewichtsmarker
- (2) Capping-Protein (DEAE-Sephrose Cl 6B-Chromatographie)
- (3) Zusammensetzung des Sedimentes der Zentrifugationsexperimente
- (4) 21 kDa-Peptid, isoliert mittels Gelfiltration

3.1.3. Affinitäts-Chromatographie

Bei der Affinitäts-Chromatographie handelt es sich um eine schnelle, hoch-spezifische Trennungsmethode. Der hohe Reinigungseffekt beruht auf der Ausnutzung einer spezifischen Eigenschaft des Proteins. Die Reinigung des Capping-Proteins mit Hilfe einer Affinitätssäule wurde mit dem Ziel verfolgt, die Aktin-bindende Fähigkeit des Proteins auszunutzen. Zunächst wurde ein Agarose-Gel, Affi Gel 10 von Bio-Rad, mit DNase I kovalent gekoppelt (1 mg DNase I/ml Gel (93)). Die Agarose-Affinitätssäule wurde dann mit monomerem Aktin gesättigt, das G-Aktin wird durch nichtkovalente Bindung an die DNase I fixiert (47). Diese Affinitätssäule erwies sich jedoch für die Reinigung des Capping-Proteins als ungeeignet, denn anhand fluorimetrischer Untersuchungen stellte sich heraus, daß das Capping-Protein nicht an die Säule adsorbiert wird. Das Capping-Protein besitzt damit keine Affinität zu G-Aktin, diese Beobachtung wurde auch bei anderen Experimenten gemacht (s. Kap. 3.3.2.).

Im folgenden wurde versucht, die Wechselwirkung zwischen dem Capping-Protein und Aktinfilamenten auszunutzen. Da die Bindungskonstante der DNase I für F-Aktin um den Faktor 40 000 kleiner ist als für G-Aktin (48), wurden chemisch vernetzte G-Aktin-Trimere präpariert (s. Kap. 2.4.). Aktin-Trimere sind die kleinsten Aktinpolymeren, die be-

zöglich ihres Polymerisationsverhaltens die Eigenschaften von Aktinfilamenten besitzen (75,94,95). Sie können als Nukleus für die Aktinpolymerisation eingesetzt werden (78). Die Polymerisations-inhibierende Aktivität des Capping-Proteins hinsichtlich der Aktin-Trimeren wurde fluorimetrisch kontrolliert. Ein Effekt des Capping-Proteins auf die Nukleation der Aktinpolymerisation durch Aktin-Trimere war vorhanden (Abb. 7). Jedoch stellte es sich heraus, daß Aktin-Trimere nicht an DNase I binden.

Die Aktin-Trimeren wurden nun direkt an das Agarose-Gel Affi Gel 15 von Bio-Rad gekoppelt. Die so erhaltene Affinitätssäule wurde mit dem Puffersystem äquilibriert, in dem die Polymerisations-inhibierende Aktivität des Capping-Proteins fluorimetrisch gemessen wurde. Unter diesen Bedingungen sollte das Capping-Protein spezifisch an die Aktin-Trimeren der Affinitätssäule adsorbiert werden. Die Affinitätssäule erwies sich jedoch für die Reinigung als ineffektiv. Der Grund dafür ist die vermutlich zu geringe Konzentration an Aktin-Trimeren, die nach der Lowry-Methode (86) ermittelte Konzentration betrug $0,15 \mu\text{M}$. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß die Bindungsstelle für das Capping-Protein durch die Kopplung mit dem Agarose-Gel blockiert wird.

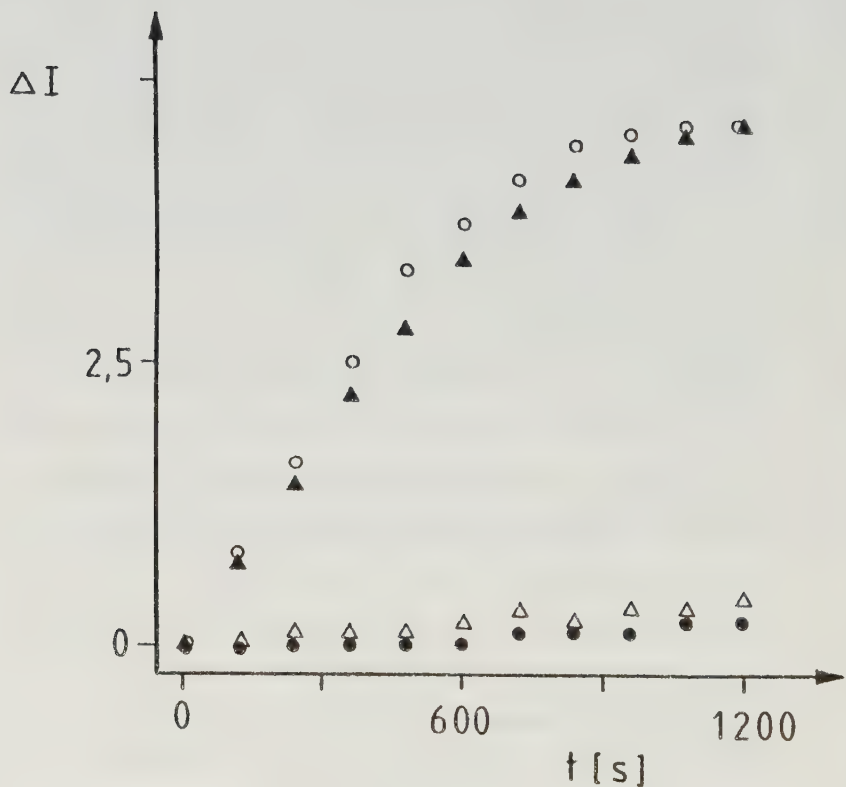


Abb. 7: Effekt des Capping-Proteins auf die Nukleation der Aktinpolymerisation durch Aktin-Trimere. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenzintensitätsänderung ΔI (beliebige Einheiten). (o) 2 μM G-Aktin + 0,5 μM F-Aktin; (▲) 2 μM G-Aktin + 1 nM Aktin-Trimere; (Δ) 2 μM G-Aktin + 1 nM Aktin-Trimere + Capping-Protein (etwa 0,3 μM); (●) 2 μM G-Aktin (nicht nukleierte Aktinpolymerisation).

3.2. Enzymatische Verdauung

Anhand der tryptischen Verdauung sollte der Nachweis erbracht werden, daß es sich bei dem Capping-Protein um Peptide handelt. Das Capping-Protein wurde deshalb mit Trypsin inkubiert und die Proteolyse nach 15 Min. mit Trypsin-Inhibitor abgestoppt (s. Kap. 2.10.). Die anschließenden fluorimetrischen Untersuchungen der Trypsin behandelten Proben zeigten, daß die Polymerisations-inhibierende Aktivität des Proteins nicht mehr vorhanden war. Die Nicht-Resistenz des Capping-Proteins gegenüber Proteasen läßt den Schluß zu, daß es sich um Peptide handelt.

3.3. Fluoreszenzmessungen

3.3.1. Aktin/Capping-Protein-Interaktion

Die Kinetik der Aktinpolymerisation wurde anhand eines kovalent an Aktin gebundenen Fluorophors sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit des Capping-Proteins fluorimetrisch untersucht. Der Einfluß des Capping-Proteins auf das Polymerisationsverhalten von Aktin zeigte sich durch die Verzögerung oder Verhinderung der nukleierten Aktinpolymerisation. Dieser Effekt, der bei der Reinigung des Proteins zur Identifizierung ausgenutzt wurde, beruht auf der Assoziation des Capping-Proteins mit Aktinfilamenten. Die F-Aktin/Capping-Protein-Interaktion wurde durch Variation der Capping-Protein-Konzentration bei identischen Aktinkonzentrationen in verschiedenen Meßreihen genauer untersucht. Die Gesamt-Aktinkonzentration betrug bei diesen Fluoreszenzmessungen $2,5 \mu\text{M}$, vorgegeben in Form von $0,5 \mu\text{M}$ F-Aktin und $2,0 \mu\text{M}$ G-Aktin, die gewählten Capping-Protein-Konzentrationen lagen im Bereich von $0,13 \mu\text{M}$ bis $0,65 \mu\text{M}$. Die Aktinpolymerisation wurde durch Zugabe von 2 mM MgCl_2 und 100 mM KCl gestartet. Die Polymerisationskurven der Capping-Protein-haltigen Proben (Abb. 8) zeigen eine Verlangsamung der Polymerisationsgeschwindigkeit des Aktins. So wird die halbmaximale Polymerisation bei der nicht mit Capping-Protein versetzten Aktinlösung bereits

nach einer Reaktionszeit von 4,5 Minuten erreicht, während in der 0,65 μM Capping-Protein enthaltenden Probe erst nach einer Reaktionszeit von 14 Minuten 50 % des G-Aktins polymer vorliegen.

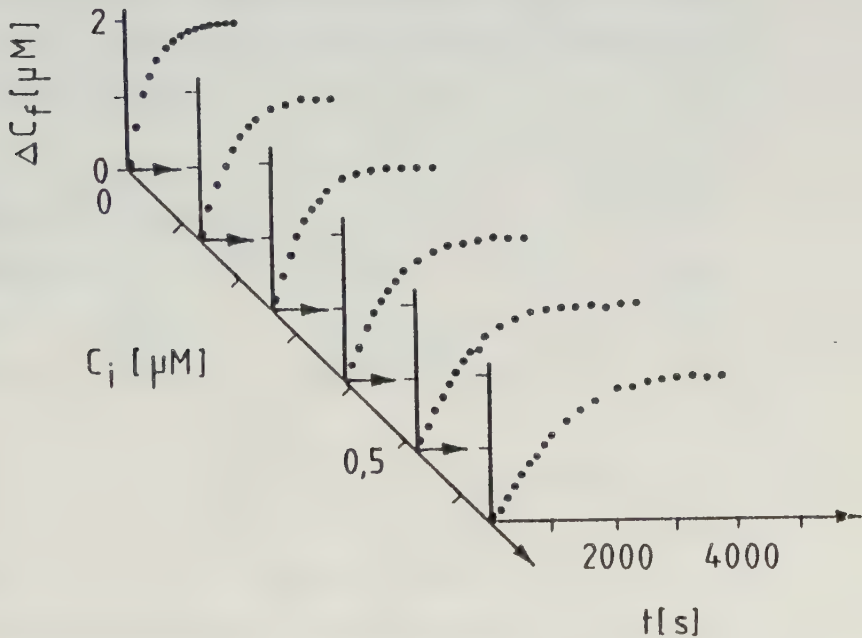


Abb. 8: Polymerisationsverhalten von 2 μM G-Aktin (Anfangskonzentration) in Gegenwart verschiedener Capping-Protein-Konzentrationen c_i und 0,5 μM F-Aktin (Anfangskonzentration). Δc_f : Zunahme der Konzentration an polymerem Aktin, t : Zeit. Experimentelle Bedingungen: 2 mM MgCl_2 , 100 mM KCl , 37 °C.

Die nach beendeter Polymerisation vorliegende Gleichgewichts-Monomerenkonzentration der Lösung ist unabhängig von der Konzentration der Filamentenden. Die Geschwindigkeit jedoch, mit der sich die Gleichgewichtskonzentration des G-Aktins einstellt, hängt von der Filamentendenkonzentration ab. Da die experimentellen Versuchsbedingungen der verschiedenen Meßreihen identisch waren, kann man von einer annähernd gleichen Konzentration an Filamentenden für die einzelnen Meßreihen ausgehen. Die unterschiedliche Einstellungsgeschwindigkeit der Gleichgewichts-Monomerenkonzentration, also die Verzögerung der Polymerisationsgeschwindigkeit des Aktins in Abhängigkeit von der Capping-Proteinkonzentration, läßt sich damit erklären, daß das Capping-Protein den Monomerenverbrauch an vorhandenen Filamentenden inhibiert.

Die Polymerisations-inhibierende Aktivität des Capping-Proteins ist bei Abwesenheit von KCl bei ansonsten gleichen Versuchsbedingungen bedeutend größer (Abb. 9). In Gegenwart von Kaliumionen (100 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$) wurde für eine entsprechende Verlangsamung der Aktinpolymerisation etwa die 15-fache Konzentration an Capping-Protein benötigt wie bei Abwesenheit von Kaliumionen (0 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$). Bei den durchgeführten Meßreihen ohne Kaliumchlorid konnte selbst bei einer Capping-Protein-Konzentration von 9 nM eine Retardierung der Polymerisation gemessen werden. Verglichen mit der eingesetzten F-Aktinkonzentration (0,5 μM),

bezogen auf die Aktinfilamentuntereinheiten, ergibt sich daraus ein Capping-Protein/Aktin-Verhältnis von 1:50. Das Capping-Protein beeinflusst damit in weit unterstöchiometrischem Verhältnis die Polymerisationsgeschwindigkeit des Aktins. Der ausgeprägte meßbare Effekt läßt den Schluß zu, daß das Capping-Protein spezifisch an die Filamentenden und nicht an die Filamentuntereinheiten entlang der Aktinfilamente bindet.

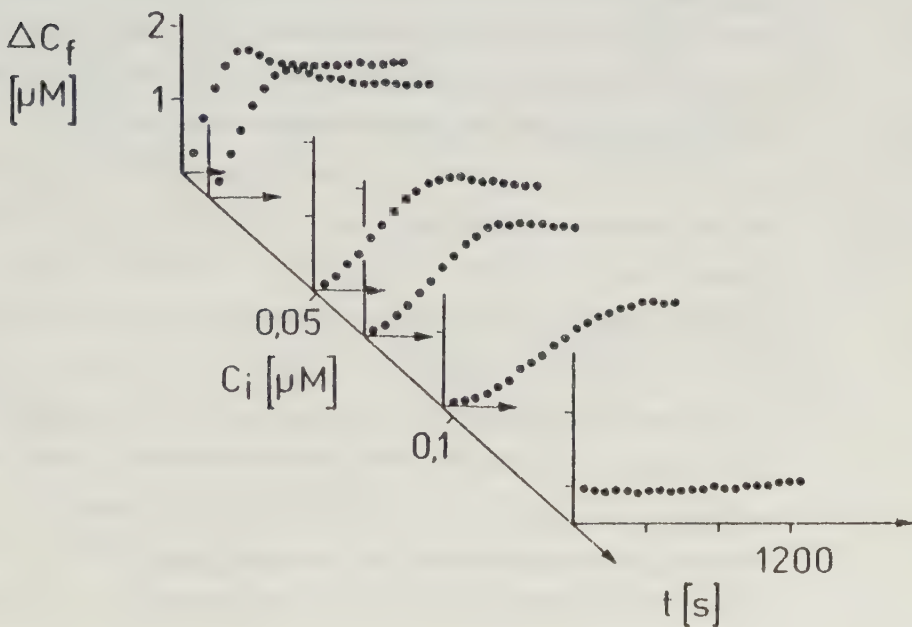


Abb. 9: Polymerisationsverhalten von 2 µM G-Aktin (Anfangskonzentration) in Gegenwart verschiedener Capping-Protein-Konzentrationen c_i und 0,5 µM F-Aktin (Anfangskonzentration). Δc_f : Zunahme der Konzentration an polymerem Aktin, t : Zeit. Experimentelle Bedingungen: 2 mM MgSO₄, 27 °C.

Die gewählten Capping-Protein-Konzentrationen variierten zwischen $0,009 \mu\text{M}$ und $0,144 \mu\text{M}$, in Bezug auf die Aktin-filamentuntereinheiten lag also bei allen Meßreihen ein unterstöchiometrisches Verhältnis vor. Die Größenordnung des Polymerisations-inhibierenden Effekts in Abhängigkeit von der Konzentration ist in Abbildung 10a dargestellt. Bereits eine Konzentration von $0,03 \mu\text{M}$ Capping-Protein führte zu einer halbmaximalen Verzögerung der Polymerisation des G-Aktins. Bei Capping-Protein-Konzentrationen im Bereich von $0,08 - 0,09 \mu\text{M}$ waren unter den vorliegenden Versuchsbedingungen etwa 75 % der Aktinfilamente mit Capping-Protein assoziiert. Durch die Capping-Protein/Aktin-Interaktion konnte, belegt durch experimentelle Kinetikmessungen, der Monomerenverbrauch und damit das Wachstum der Aktinfilamente fast vollständig inhibiert werden. Daraus folgt, daß das Capping-Protein an die schnell wachsenden stumpfen Enden der Aktinfilamente bindet. Das spitze Ende der Aktinfilamente polymerisiert um den Faktor 5 - 10 langsamer als das stumpfe Ende (12, 96, 97). Monomere werden daher hauptsächlich am stumpfen Ende in die Filamente eingebaut. G-Aktin- und Capping-Protein-Moleküle konkurrieren um dieselbe Bindungsstelle am stumpfen Ende der Aktinfilamente.

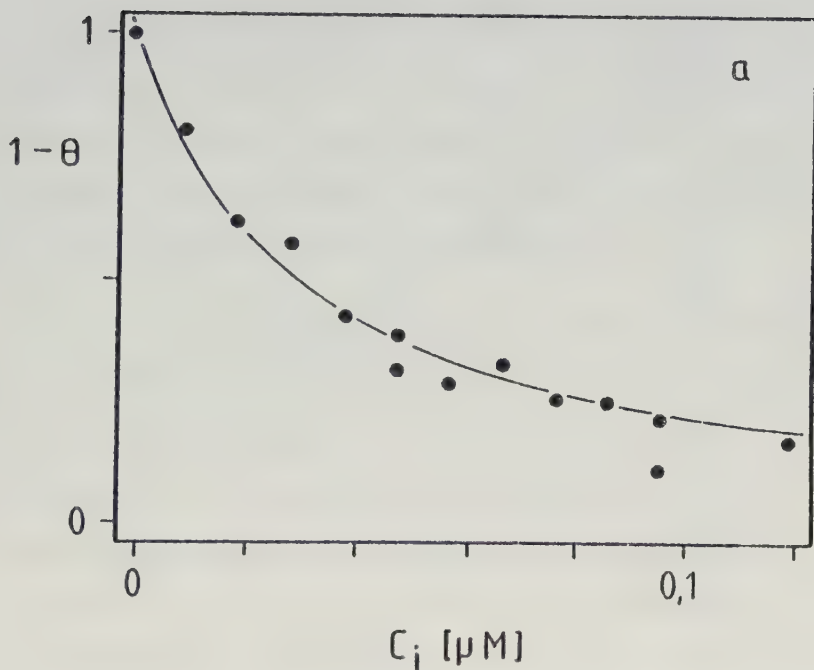
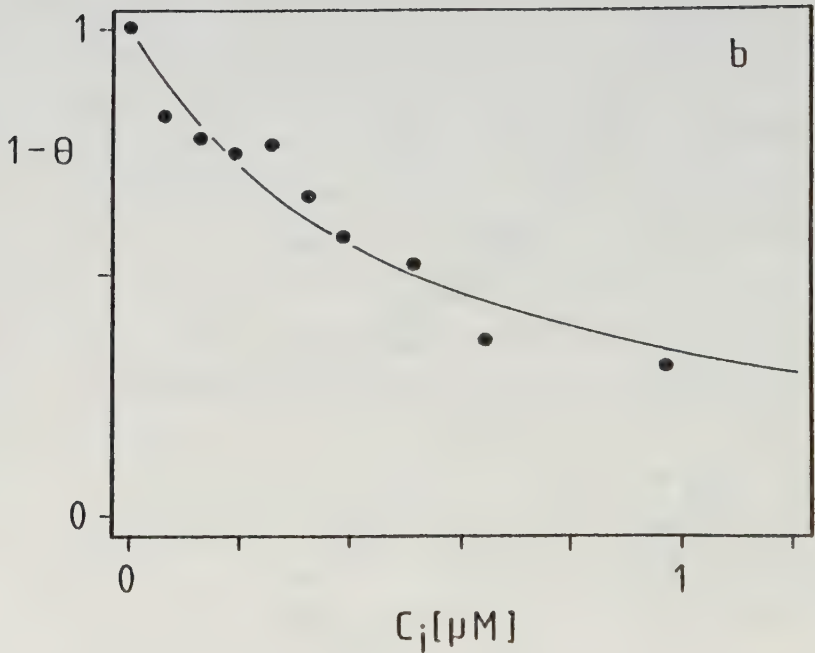


Abb. 10: Darstellung des Anteils an freien stumpfen Aktinfilamentenden ($1-\theta$) in Abhängigkeit von der Capping-Protein-Konzentration c_i . (a) Experimentelle Bedingungen: 2 mM MgCl_2 , 0 mM KCl, 37 °C. Durchgezogene Linie: Anpassung der ermittelten Kinetikdaten mit $K_C = 35 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. (b) Experimentelle Bedingungen: 2 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, 37 °C. Durchgezogene Linie: Anpassung der ermittelten Kinetikdaten mit $K_C = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. K_C : Gleichgewichtskonstante für die Bindung des Capping-Proteins an das stumpfe Aktinfilamentende.



Der in Gegenwart von Kalium- und Magnesiumionen ermittelte Anteil an freien Aktinfilamentenden ist in Abb. 10b dargestellt. Das Capping-Protein zeigt bei Anwesenheit von Kaliumionen eine sehr viel geringere Bindungsaffinität zu den Filamentenden, erkennbar an den deutlich höheren Capping-Protein-Konzentrationen, die zur Erreichung des gleichen Effektes wie in K^+ -freiem Medium eingesetzt werden müssen. Die halbmaximale Verzögerung der Aktinpolymerisation wurde erst bei einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ Capping-Protein beobachtet. Diese Konzentration entspricht der eingesetzten F-Aktinkonzentration, bezogen auf die Filamentunterein-

heiten; die Capping-Protein-Konzentration war daher eindeutig höher als die Konzentration an stumpfen Filamentenden. Bei halbmaximaler Retardierung sind etwa 50 % der Filamentenden mit Capping-Protein assoziiert, der überwiegende Teil des Capping-Proteins wurde also aufgrund geringer Bindungsaffinität nicht gebunden.

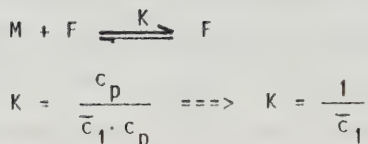
Die Gleichgewichtskonstante für die Bindung des Capping-Proteins an das stumpfe Ende von Aktinfilamenten in Gegenwart und Abwesenheit von Kaliumionen kann auf der Basis der vorhandenen experimentellen Daten und anhand einfacher theoretischer Überlegungen abgeschätzt werden. Die zeitliche Änderung der freien Monomerenkonzentration (c_1) durch Assoziation und Dissoziation an den stumpfen Aktinfilamentenden läßt sich beschreiben durch (s. Abb. 15) :

$$\frac{dc_1}{dt} = -k_b^+ \cdot c_1 \cdot c_p + k_b^- \cdot c_p \quad (1)$$

k_b^+ ist die Geschwindigkeitskonstante für die Assoziation eines Monomeren an das stumpfe Filamentende, k_b^- die Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation einer endständigen Filamentuntereinheit vom stumpfen Ende und c_p die Konzentration an stumpfen Filamentenden (73, 75, 98).

Die Gleichgewichtskonstante dieser Reaktion, also der Quotient (k_b^+/k_b^-) der beiden Geschwindigkeitskonstanten, entspricht dem reziproken Wert der sich im Gleichgewicht

einstellenden Monomerenkonzentration ($\bar{c}_1$) des stumpfen Endes:



Die Gleichgewichts-Monomerenkonzentration ist unabhängig von der Filamentendenkonzentration, da sich die Konzentration an Filamentenden (F) durch die Assoziation und Dissoziation von Aktinmonomeren (M) nicht ändert. Unter Gleichgewichtsbedingungen, wenn Monomere mit gleicher Geschwindigkeit an die Filamentenden binden wie Filamentuntereinheiten abdissoziieren, gilt daher:

$$k_b^- = k_b^+ \cdot \bar{c}_1 \quad (2)$$

Durch Kombination der Gleichungen (1) und (2) ergibt sich für die zeitliche Änderung der freien Monomerenkonzentration folgender Ausdruck:

$$\frac{dc_1}{dt} = -k_b^+ \cdot c_p \cdot (c_1 - \bar{c}_1) \quad (3)$$

Die Lösung der Gleichung erhält man durch Integration mit den Randbedingungen $c_1 = c_1 \text{ tot}$ für $t = 0$ und $c_1 = \bar{c}_1$ für $t \rightarrow \infty$:

$$c_1 = \overline{c_1} + (c_{1 \text{ tot}} - \overline{c_1}) e^{-k_b^+ \cdot c_p \cdot t} \quad (4)$$

Die anhand dieser Gleichung berechneten Exponentialkurven konnten durch Variation des Wertes für das Produkt $k_b^+ \cdot c_p$ den experimentell ermittelten Polymerisationskurven angepaßt werden (Abb. 11). Bei der Ableitung der Gleichungen (1) - (4) wurde der Einfluß des spitzen Endes vernachlässigt, weil die Reaktionen am spitzen Filamentende wesentlich langsamer ablaufen als am stumpfen Ende.

Zwischen dem Produkt $k_b^+ \cdot c_p$ und der Zeit der halbmaximalen Polymerisation (τ) besteht folgende Beziehung:

$$\begin{aligned} \frac{c_{1 \text{ tot}} - \overline{c_1}}{2} &= (c_{1 \text{ tot}} - \overline{c_1}) e^{-k_b^+ \cdot c_p \cdot \tau} \\ \implies k_b^+ \cdot c_p &= \frac{\ln 2}{\tau} \end{aligned} \quad (5)$$

Wird ein Teil der Filamentenden mit Capping-Protein besetzt, so beträgt die Konzentration an freien Filamentenden $= (1 - \theta) \cdot c_p$, wobei θ dem Besetzungsgrad entspricht:

$$(1 - \theta) \cdot c_p \cdot k_b^+ = \frac{\ln 2}{\tau} \quad (6)$$

Durch Kombination der Gleichungen (5) und (6) erhält man:

$$1 - \theta = \frac{\tau_{\text{ohne Capping-Protein}}}{\tau_{\text{mit Capping-Protein}}} \quad (7)$$

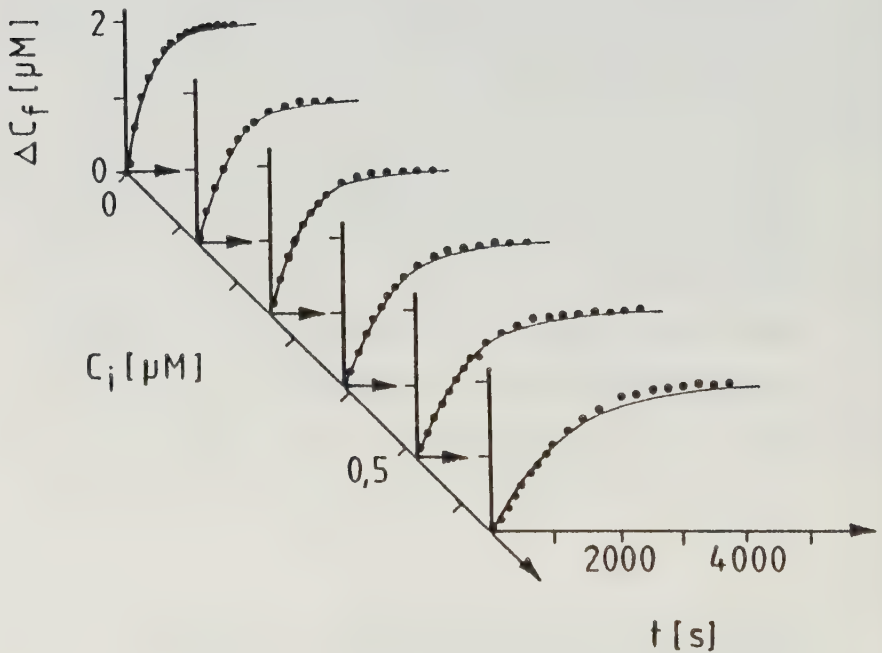


Abb. 11: Mathematische Anpassung an experimentell ermittelte Polymerisationskurven durch Variation des Wertes für $k_b^+ \cdot c_p$. (•••), experimentell erhaltene Kinetikdaten; (—), berechnete Kurven. Experimentelle Bedingungen: 2 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 37 °C.

Die Halbwertzeiten der Aktinpolymerisation bei verschiedenen Capping-Protein-Konzentrationen (τ_{mit}) und der Referenzprobe (τ_{ohne}) wurden experimentell bestimmt, der jeweilige Anteil an freien stumpfen Filamentenden ($1 - \theta$) nach Gleichung (7) berechnet. Die Abbildung 10a, b zeigt die rechnerisch ermittelten ($1 - \theta$)-Werte in Abhängigkeit von der Capping-Protein-Konzentration.

Die Gleichgewichtskonstante der Capping-Reaktion läßt sich beschreiben durch:

$$K_C = \frac{c_p \cdot \theta}{c_p \cdot (1 - \theta) \cdot c_i} \quad (8)$$

$c_p \cdot \theta$: Konzentration an gecappten stumpfen Filamentenden
 $c_p \cdot (1 - \theta)$: Konzentration an freien stumpfen Filamentenden
 c_i : Konzentration an nicht gebundenem Capping-Protein

Die Umformung dieser Gleichung führt zu dem Ausdruck:

$$(1 - \theta) = \frac{1}{1 + K_C \cdot c_i} \quad (9)$$

Da die Konzentration an freiem Capping-Protein deutlich über der Konzentration des an Aktinfilamentenden gebundenem liegt (s. Kap. 3.4.), entspricht die freie Capping-Protein-Konzentration etwa der jeweils eingesetzten Gesamtkonzentration. Mit dieser Näherung berechnet sich die Gleichgewichtskonstante für die Bindung des Capping-

Proteins an das stumpfe Ende von Aktinfilamenten zu $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ in Gegenwart von Kalium- und Magnesiumionen (2 mM MgCl_2 , 100 mM KCl) und zu $35 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ bei Abwesenheit von Kaliumionen und Anwesenheit von Magnesiumionen (2 mM MgCl_2). Die durchgezogenen Linien der Abb. 10a, b stellen die nach Gleichung (9) mittels dieser K_C -Werte berechneten Kurven dar.

Zusammenfassend konnte die Verlangsamung der Elongationsgeschwindigkeit der Filamente durch Anwesenheit von Capping-Protein sowohl mit als auch ohne K^+ nachgewiesen werden. Für die Capping-Reaktion wurden aufgrund der K^+ -abhängigen Bindungsaffinität unterschiedliche Assoziations-Gleichgewichtskonstanten ermittelt. Eine Ca^{2+} -Sensitivität der Capping-Protein/Aktin-Interaktion wurde nicht gefunden, die Polymerisations-Inhibierende Aktivität des Proteins war unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration.

3.3.2. Untersuchung des Einflusses des Capping-Proteins auf die Nukleation von Aktin

Während die nukleierte Aktinpolymerisation einen exponentiellen Polymerisationsverlauf aufweist, beobachtet man bei nicht nukleierter Aktinpolymerisation einen sigmoiden Verlauf. Die anfängliche lag-Phase beruht auf der relativ langsamen Bildung von Aktin-Oligomeren, die als Nuklei wirken. Mindestens drei G-Aktinmoleküle müssen sich

vereinigen, bevor ein Filamentwachstum eintreten kann (75, 78). Die lag-Phase kann durch Proteine, die Nukleus-Eigenschaften besitzen, wie z. B. Gelsolin, unterdrückt werden (70, 99).

Zur Klärung, ob das Capping-Protein als Nukleus wirkt, wurde der Aktinpolymerisationsverlauf reiner G-Aktinlösungen in Gegenwart von Capping-Protein untersucht. Die verwendeten G-Aktinlösungen wurden 30 Minuten mit 50 000 g zentrifugiert, um eventuell vorhandene Spuren an polymerem Aktin zu entfernen. Die G-Aktinkonzentration betrug bei diesen Messungen 2 μM , die Capping-Protein-Konzentration variierte zwischen 0,13 μM und 0,65 μM . Die erhaltenen Polymerisationskurven (Abb. 12) zeigen, daß auch bei Anwesenheit von Capping-Protein der typisch sigmoide Polymerisationsverlauf vorliegt. Die lag-Phase beweist, daß keine Filamentbildung aufgrund Capping-Protein-nukleierter Polymerisation stattfindet, d. h. die G-Aktinmoleküle polymerisieren nicht auf das Protein auf. Erst nachdem sich durch Selbstassoziation von Monomeren Nuklei gebildet haben und ein Filamentwachstum eintritt, beeinflußt das Capping-Protein den Polymerisationsverlauf. Durch Interaktion mit entstandenen Aktinfilamenten wird der Monomerenverbrauch an den Filamentenden inhibiert und die Polymerisationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Capping-Protein-Konzentration verlangsamt (Abb. 12).

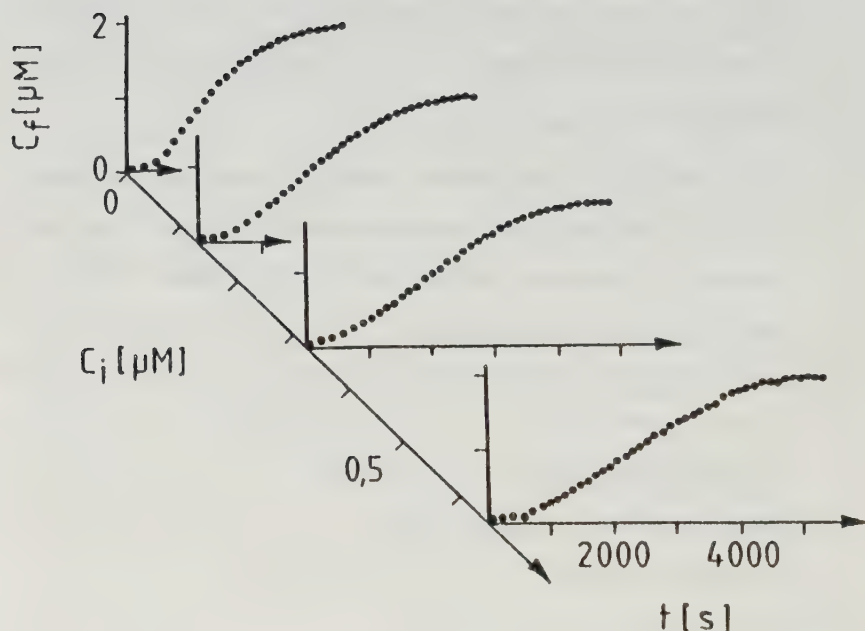


Abb. 12: Polymerisation von 2 μM G-Aktin in Gegenwart verschiedener Capping-Protein-Konzentrationen c_i . c_f : Konzentration an polymerem Aktin, t : Zeit. Experimentelle Bedingungen: 2 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 37 $^{\circ}C$.

Die vorliegenden Resultate belegen, daß das Capping-Protein die Filamentbildung nicht nukleiert; diese Eigenschaft ist für ein Protein, das an die Enden von Aktinfilamenten bindet, ungewöhnlich. Die Aktin-bindende Fähigkeit bezieht sich vermutlich ausschließlich auf Aktinfilamente, denn Affinität zu monomerem Aktin konnte anhand der experimentellen Daten nicht nachgewiesen werden.

3.3.3. Einfluß des 21 kDa-Peptids auf die Aktinpolymerisation

Durch gezielte Fraktionierung (Sepharose Cl 6B-Gelfiltration, Kap. 3.1.2.) wurden Proben mit reinem 21 kDa-Peptid erhalten. Mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen wurde der Effekt dieses Peptids auf das Wachstum von Aktinfilamenten ermittelt. Die Polymerisations-inhibierende Eigenschaft des 21 kDa-Peptids wurde dabei als Konkurrenzreaktion zur Bindung von Aktinmonomeren an die stumpfen Filamentenden gemessen. Untersucht wurde das Polymerisationsverhalten von 2,0 μM G-Aktin und 0,5 μM F-Aktin in Abhängigkeit von der 21 kDa-Peptidkonzentration, die gewählten Peptidkonzentrationen lagen im Bereich von 0,272 - 3,26 μM .

Der Einfluß des 21 kDa-Peptids auf die Polymerisationsgeschwindigkeit des Aktins in Gegenwart von Magnesium- und Kaliumionen ist in Abb. 13 dargestellt. Die Aktinstandardlösung erreicht nach einer Reaktionszeit von 4,5 Minuten die halbmaximale Konzentration an polymerisiertem G-Aktin, in den 2,17 - 3,26 μM 21 kDa-Peptid enthaltenden Proben liegt erst nach Ablauf einer Reaktionszeit von etwa 20 Minuten 50 % des eingesetzten G-Aktins polymer vor. Bei niedrigeren Peptidkonzentrationen wird erwartungsgemäß eine geringere Verzögerung der Aktinpolymerisation beobachtet. Die zugehörige Polymerisationskurve einer 0,815 μM Peptid-haltigen Probe weist eine

kleinere Steigung auf als die Referenzkurve, die Polymerisationsreaktion ist jedoch nur wenige Minuten nach der Aktinstandardprobe beendet (Abb. 13).

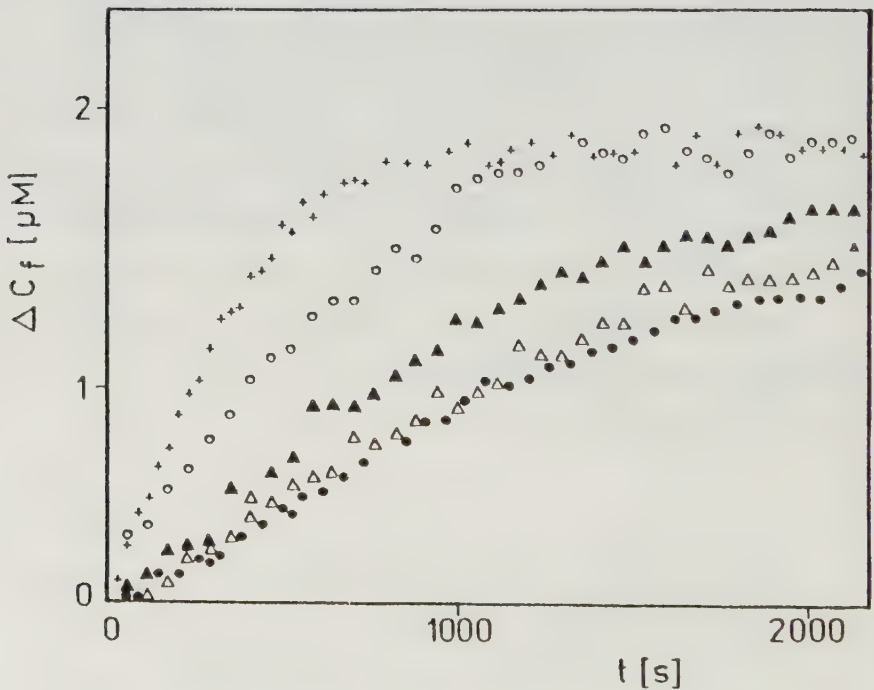


Abb. 13: Polymerisationsverhalten von 2 µM G-Aktin (Anfangskonzentration) in Gegenwart von 0,5 µM F-Aktin (Anfangskonzentration) und verschiedener Konzentrationen an 21 kDa-Peptid: (+) 0 µM, (o) 0,815 µM, (▲) 1,0867 µM, (Δ) 2,173 µM, (●) 3,26 µM. ΔC_f : Zunahme der Konzentration an polymerisiertem Aktin. Experimentelle Bedingungen: 2 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 37 °C.

Aus den Meßreihen ist ersichtlich, daß relativ hohe Peptidkonzentrationen erforderlich sind, um einen deutlichen Polymerisations-inhibierenden Effekt zu erzielen. Die bereits bei der Untersuchung der F-Aktin/Capping-Protein-Interaktion gefundene K^+ -abhängige Bindungsaffinität läßt sich auch für das 21 kDa-Peptid nachweisen. Die Polymerisations-inhibierende Aktivität ist bei Abwesenheit von Kaliumionen wesentlich stärker ausgeprägt (Abb. 14). Bei einer Peptidkonzentration von $0,27 \mu\text{M}$ war schon ein deutlicher Effekt auf die Polymerisationsgeschwindigkeit meßbar. Die Erhöhung der Konzentration des 21 kDa-Peptids auf $2,17 \mu\text{M}$ führte zur vollständigen Inhibierung der Aktinpolymerisation.

Die kritische Monomerenkonzentration, also die Konzentration, bei der sich ein Filamentende weder durch Polymerisation verlängert noch durch Depolymerisation verkürzt, ist für das spitze und das stumpfe Ende der Aktinfilamente verschieden. Unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen (2 mM MgCl_2 , $0,5 \mu\text{M}$ F-Aktin, $2 \mu\text{M}$ G-Aktin) ist die freie Monomerenkonzentration kleiner als die kritische Monomerenkonzentration des spitzen Endes, jedoch größer als die des stumpfen Endes. In dem nach beendeter Polymerisation sich einstellenden Gleichgewicht binden Aktinmonomere mit gleicher Geschwindigkeit an stumpfe Filamentenden (niedrigere kritische Monomerenkonzentration) wie

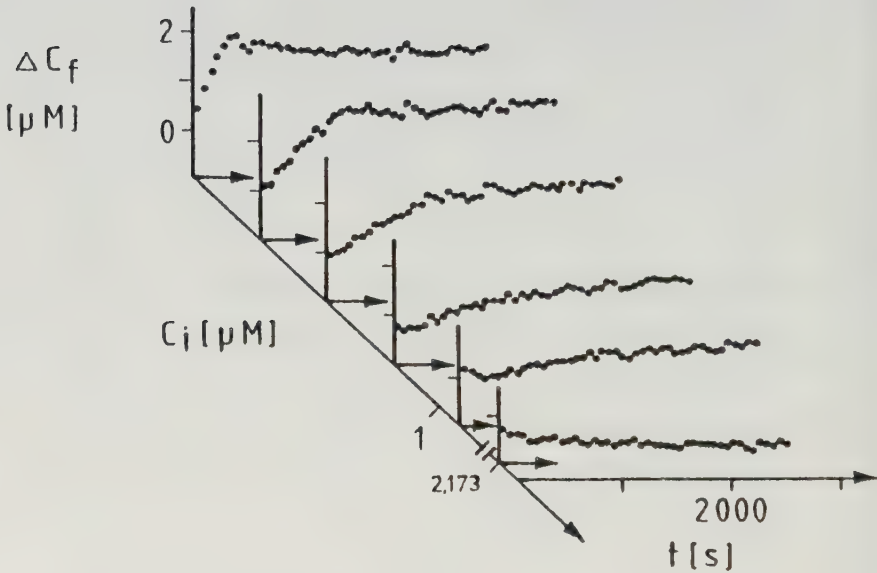


Abb. 14: Verzögerung der Aktinpolymerisation durch das 21 kDa-Peptid. Δc_f : Zunahme der Konzentration an polymerem Aktin; c_i : 21 kDa-Peptidkonzentration; t : Zeit. Experimentelle Bedingungen: 2 μ M G-Aktin und 0,5 μ M F-Aktin (Anfangskonzentrationen), 2 mM $MgCl_2$, 37 °C.

F-Aktinuntereinheiten von spitzen Filamentenden abdissoziieren. Die Gleichgewichts-Monomerenkonzentration liegt damit zwischen den kritischen Monomerenkonzentrationen der beiden Filamentenden. Wenn alle Enden frei sind (Referenzprobe), stellt sich die Treadmilling-Gleichgewichts-Monomerenkonzentration ein, die aufgrund der höheren Dynamik des stumpfen Endes nahe der kritischen Monomeren-

konzentration des stumpfen Endes liegt. Wird der Monomerenverbrauch an sich verlängernden stumpfen Filamentenden durch das 21 kDa-Peptid gehemmt, werden weiterhin Monomere durch Depolymerisation der spitzen Enden produziert. Es stellt sich ein neues Gleichgewicht ein, in dem der Monomerenverbrauch an nicht gecappten stumpfen Enden durch die Monomerenproduktion an spitzen Enden ausgeglichen wird. In dem Fall, daß alle stumpfen Enden mit 21 kDa-Peptid besetzt sind, stellt sich die kritische Monomerenkonzentration des spitzen Endes ein. Die zeitliche Änderung der freien Monomerenkonzentration durch Polymerisation oder Depolymerisation an den Filamentenden wurde fluorimetrisch verfolgt. Ein kleiner Anteil an nicht gecappten Filamentenden hat einen großen Einfluß auf die sich einstellende Monomeren-Gleichgewichtskonzentration, denn die meisten Assoziations- und Dissoziationsreaktionen finden am dynamischen stumpfen Ende statt. Ein deutlicher Effekt auf die Monomerenkonzentration, bedingt durch Dissoziation der Filamentuntereinheiten von spitzen Enden, zeigt sich erst, wenn die meisten stumpfen Filamentenden gecappt sind (100). Das Reaktionsschema der Aktinpolymerisation und der Bindung des 21 kDa-Peptids an das stumpfe Ende ist in Abb. 15 dargestellt. Die Länge der Reaktionspfeile gibt an, mit welcher Geschwindigkeit die Assoziations- und Dissoziationsreaktionen relativ zueinander ablaufen.

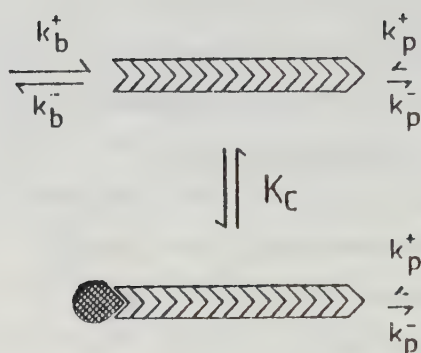


Abb. 15: Reaktionsschema der Aktinpolymerisation und der Bindung des 21 kDa-Peptids an das stumpfe Filamentende. k_b^+ , k_b^- : Geschwindigkeitskonstanten der Assoziations- und Dissoziationsreaktionen am stumpfen Ende; k_p^+ , k_p^- : Geschwindigkeitskonstanten der Assoziations- und Dissoziationsreaktionen von Aktinmonomeren am spitzen Ende. Die Länge der Reaktionspfeile gibt an, mit welcher Geschwindigkeit die Reaktionen relativ zueinander ablaufen. K_C : Gleichgewichtskonstante der Capping-Reaktion.

Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, führt eine 21 kDa-Peptidkonzentration von $2,17 \mu\text{M}$ zur vollständigen Unterdrückung der Aktinpolymerisation. Die kritische Monomerenkonzentration des spitzen Endes beträgt unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen $2,5 \mu\text{M}$ (Wegner, pers. Mitteilung), die eingesetzte freie G-Aktinkonzentration betrug $2,0 \mu\text{M}$. Die meßbare Depolymerisation läßt daher den Schluß zu, daß bei dieser Peptidkonzentration nahezu alle stumpfen Filamentenden mit 21 kDa-Peptid besetzt sind. Für die halb-

maximale Hemmung der Polymerisation wurden $0,815 \mu\text{M}$ 21 kDa-Peptid benötigt, die halbmaximale Verzögerung der Polymerisationsgeschwindigkeit des Aktins wurde schon bei einer Peptidkonzentration von $0,27 \mu\text{M}$ erzielt. Die Aktinpolymerisation kann aufgrund der wesentlich langsameren Polymerisations- und Depolymerisationsvorgänge des spitzen Filamentendes (12, 96, 97, 101-103) als fast einseitig am stumpfen Filamentende betrachtet werden. Der ausgeprägte Effekt auf die Polymerisation des Aktins beweist also, daß das 21 kDa-Peptid spezifisch die Assoziations- und Dissoziationsreaktionen von Monomeren am stumpfen Filamentende inhibiert. Da die Polymerisationsgeschwindigkeit auch bei unterstöchiometrischem Peptid/G-Aktin-Verhältnis deutlich retardiert wurde, bindet das 21 kDa-Peptid nicht an Aktinmonomere, sondern nur an die Filamentenden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den in Kap. 3.3.1. und 3.3.2. erhaltenen Resultaten.

3.3.3.1. Untersuchung der G-Aktin-Abhängigkeit der Interaktion von Aktin und 21 kDa-Peptid

Die Beobachtung, daß der meßbare Effekt auf die Polymerisationsgeschwindigkeit des Aktins auch bei geringen 21 kDa-Peptidkonzentrationen (unterstöchiometrisches Verhältnis) sehr ausgeprägt ist, wurde bei Anwesenheit von Kaliumionen nicht gemacht. Anhand von Kontrollexperimenten wurde deshalb

die Frage geklärt, ob das 21 kDa-Peptid in K^+ -haltigem Medium die Aktinpolymerisation beeinflusst, indem es wie Profilin an Aktinmonomere bindet. Das Protein Profilin bindet hochaffin an G-Aktin, der Profilin/Aktin-Komplex ist nicht zur Polymerisation fähig und der Entzug der Monomeren aus dem Gleichgewicht hat die Depolymerisation von F-Aktin zur Folge (42-46).

Für den Fall, daß das 21 kDa-Peptid die Polymerisation durch die Bindung an Aktinmonomere inhibiert, sollten unterschiedliche Endfluoreszenzintensitäten im Vergleich zur Referenzprobe gemessen werden. Die Differenz zwischen den Endfluoreszenzintensitäten ergäbe sich aus dem der Polymerisation nicht mehr zur Verfügung stehenden Monomerenanteil, der als G-Aktin/Peptid-Komplex vorliegt. Durch Variation der G-Aktinkonzentration bei konstanter 21 kDa-Peptid- und F-Aktinkonzentration müßte der Anteil an G-Aktin/Peptid-Komplex relativ zur freien G-Aktinkonzentration verändert werden. Die entsprechenden Polymerisationskurven sollten daher einen deutlich unterschiedlichen Verlauf aufweisen.

Zur Überprüfung, ob der Polymerisationsverlauf G-Aktin-Abhängigkeit zeigt, wurde die Monomerenkonzentration im Bereich von 1 - 4 μM variiert; die jeweilige F-Aktinkonzentration betrug 0,5 μM . Die Kinetikmessungen wurden mit verschiedenen Peptidkonzentrationen (0 μM , 1,09 μM ,

2,17 μM) durchgeführt, die KCl-Konzentration der Meßlösungen wurde wiederum auf einen physiologischen Wert von 100 mM eingestellt. Da die Fluoreszenzintensitäten von der eingesetzten F-Aktin- und G-Aktinkonzentration abhängig sind (s. Kap. 2.8.), war kein direkter Vergleich der erhaltenen Polymerisationskurven möglich. Zur Gewährleistung einer guten Vergleichsmöglichkeit war daher die Normierung der Meßdaten erforderlich, die Ergebnisse sind in den Abb. 16 - 18 dargestellt.

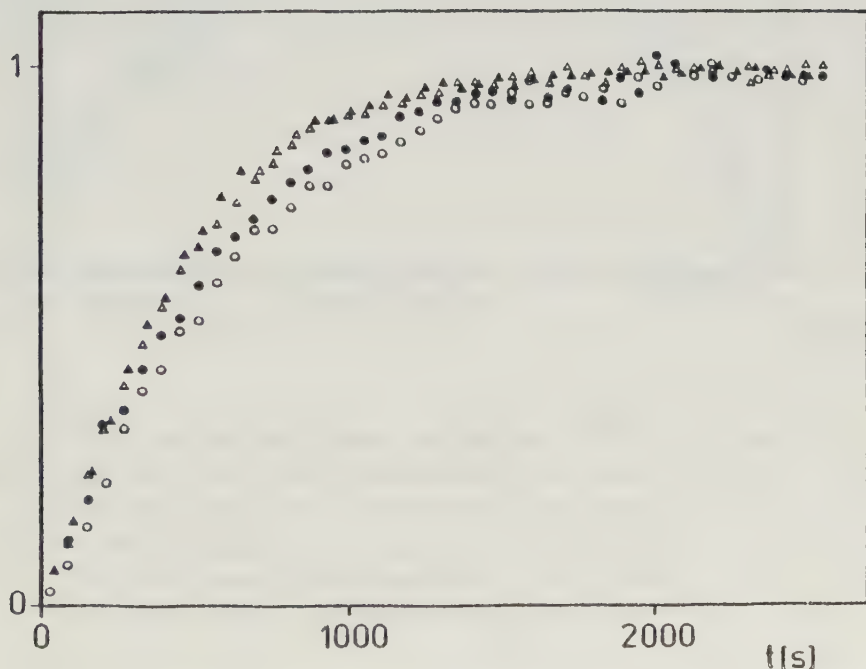


Abb. 16: Polymerisationsverlauf verschiedener Konzentrationen an G-Aktin: (o) 1 μM , (●) 2 μM , (Δ) 3 μM , ($\blacktriangle$) 4 μM in Gegenwart von 0,5 μM F-Aktin. Die Normierung erfolgte nach $(I - I_A) / (I_E - I_A)$ mit I_A = Anfangsfluoreszenzintensität ($t=0$), I_E = Endfluoreszenzintensität ($t \rightarrow \infty$), I = Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit t . Nach beendeter Polymerisationsreaktion be-

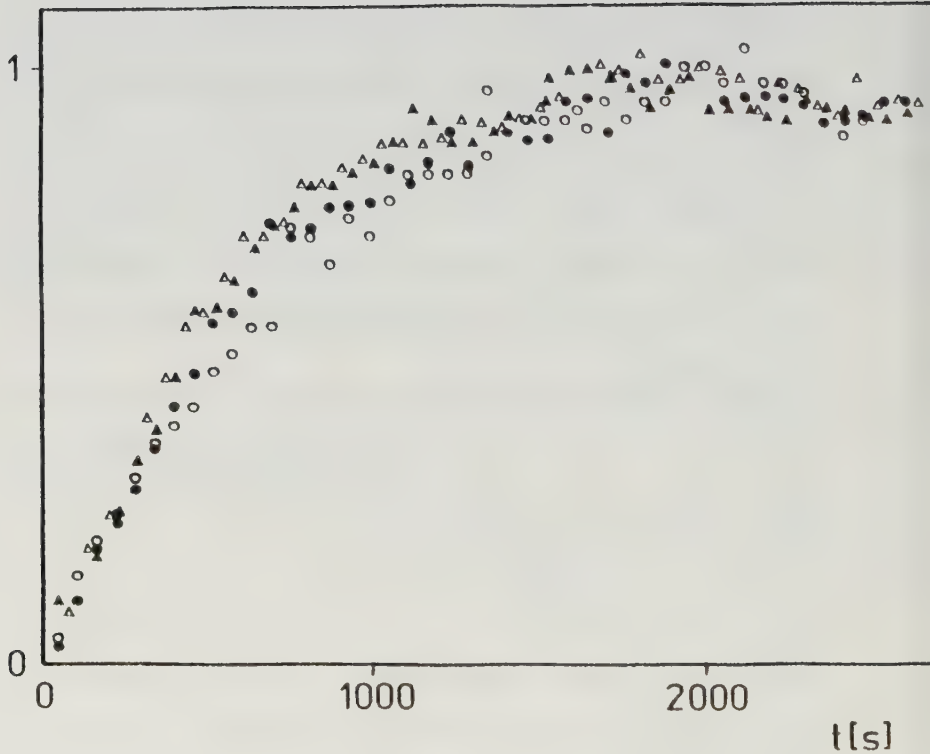


Abb. 17: Polymerisationsverlauf verschiedener Konzentrationen an G-Aktin: ($\circ$) 1 μM , ($\bullet$) 2 μM , (Δ) 3 μM , ($\blacktriangle$) 4 μM in Gegenwart von 0,5 μM F-Aktin und 1,09 μM 21 kDa-Peptid. Dargestellt sind die normierten, zeitabhängig erhaltenen Meßdaten. (Normierung der Meßdaten: s. Text Abb. 16)

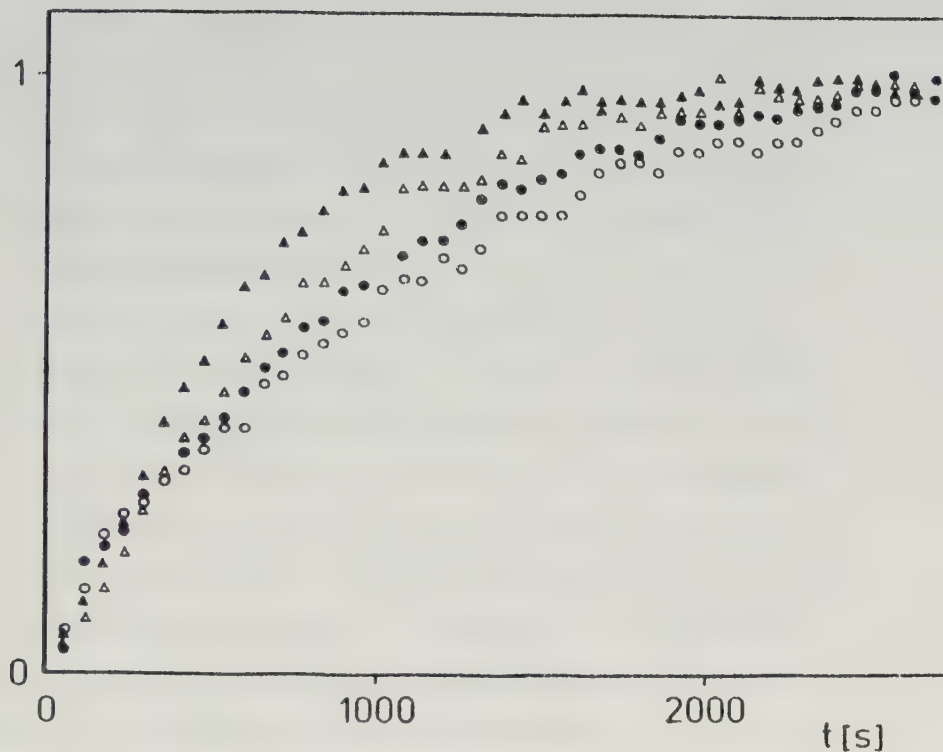


Abb. 18: Polymerisationsverlauf verschiedener Konzentrationen an G-Aktin: (o) 1 μM , (●) 2 μM , (Δ) 3 μM , ($\blacktriangle$) 4 μM in Gegenwart von 0,5 μM F-Aktin und 2,17 μM 21 kDa-Peptid. Dargestellt sind die normierten, zeitabhängig erhaltenen Meßdaten. (Normierung der Meßdaten: s. Text Abb. 16)

Aus den Abb. ist ersichtlich, daß der kinetische Verlauf der Aktinpolymerisation bei keiner der durchgeführten Meßreihen durch Variation der G-Aktinkonzentration im angegebenen Konzentrationsbereich signifikant verändert wurde. Die Peptid-haltigen Proben erreichten die gleichen Fluoreszenzwerte wie die entsprechenden Referenzproben, das nach beendeter Polymerisation vorliegende G-Aktin zu F-Aktin-Verhältnis war also identisch. Demzufolge bindet das 21 kDa-Peptid auch in K^+ -haltigem Medium nicht an Aktinmonomere.

Der Effekt des 21 kDa-Peptids auf die Polymerisationsgeschwindigkeit (Abb. 18) kann damit als Konkurrenzreaktion zur Bindung von Monomeren an das stumpfe Filamentende angesehen werden. Das Verhältnis zwischen G-Aktin und 21 kDa-Peptid wird mit zunehmender G-Aktinkonzentration ($1 - 4 \mu M$) zugunsten des G-Aktins verschoben. Da 21 kDa-Peptid- und G-Aktin-Moleküle um dieselbe Bindungsstelle am stumpfen Filamentende konkurrieren, ist die Polymerisations-inhibierende Wirkung des Peptids bei geringen G-Aktinkonzentrationen ausgeprägter (s. Abb. 18).

Ein zusätzlicher, den Polymerisationsverlauf beeinflussender Effekt ist die Möglichkeit der Filamentbildung durch Selbstassoziation von Monomeren. Die auf diese Weise entstehenden Nuklei wirken beschleunigend auf die Polymerisation, da sie die Konzentration an stumpfen Filamentenden

erhöhen. Die spontane Nukleusbildung wird mit steigender G-Aktinkonzentration begünstigt. Anhand der Polymerisationskurven der Aktinstandardlösungen (Abb. 16) ist erkennbar, daß das Gleichgewicht der Polymerisation bei den höheren G-Aktinkonzentrationen (3 - 4 μM) etwas schneller erreicht wird.

Zur vollständigen Kontrolle wurde eine mathematische Analyse der Aktinpolymerisationskinetik bei den gewählten Versuchsbedingungen durchgeführt. Das Modell berücksichtigt die Elongation der Aktinfilamente sowie die Retardierung der Polymerisation durch Bildung eines G-Aktin/Peptid-Komplexes. Die zeitliche Änderung der freien Monomerenkonzentration durch Assoziation von Aktinmonomeren und Dissoziation von Filamentuntereinheiten an den Filamentenden läßt sich beschreiben durch:

$$\begin{aligned} \frac{dc_1}{dt} &= -k^+ \cdot c_p \cdot c_1 + k^- \cdot c_p \\ &= -k^+ \cdot c_p \cdot (c_1 - \bar{c}_1) \end{aligned} \quad (10)$$

Die Konzentration an freien, nicht komplexierten Aktinmonomeren ergibt sich aus:

$$c_1 = c_{1 \text{ tot}} - c_{11} \quad (11)$$

$c_{I \text{ tot}}$: Gesamtkonzentration des G-Aktins

c_{Ii} : Konzentration des G-Aktin/Peptid-Komplexes

Die Gleichgewichtskonstante der Komplexbildungsreaktion ist gegeben durch:

$$K_M = \frac{c_{Ii}}{c_I \cdot c_P} \quad (12)$$

$$\text{mit } c_I = c_{I \text{ tot}} - c_{Ii} \quad (13)$$

$c_{I \text{ tot}}$: Gesamtkonzentration des Peptids

Durch Kombination der Gleichungen (11) - (13) erhält man folgenden Ausdruck:

$$c_I = \frac{1}{2} (c_{I \text{ tot}} - c_{I \text{ tot}} - 1/K_M) + \sqrt{\frac{1}{4} (c_{I \text{ tot}} + c_{I \text{ tot}} + 1/K_M)^2 - c_{I \text{ tot}} c_{I \text{ tot}}} \quad (14)$$

Die beiden Gleichungen (10) und (14) stehen über die Konzentration an freien Aktinmonomeren miteinander in Beziehung. Die Gleichung (14) enthält als einzigen unbekannten Parameter die Gleichgewichtskonstante K_M für die Bildung des G-Aktin/Peptid-Komplexes. Unter der Annahme, daß das 21 kDa-Peptid an Aktinmonomere bindet, ist die Konzentration an freien Aktinfilamentenden einer Peptid-haltigen Probe gleich der Filamentendenkonzentration (c_p) der Aktin-

standardprobe. Das Produkt $k^+ \cdot c_p$ der Gleichung (10) kann daher als Konstante behandelt werden. Die Gleichgewichts-Monomerenkonzentration ($\overline{c_1}$), bestimmbar nach der von Wegner (101) bzw. Wegner und Isenberg (104) beschriebenen Methode, beträgt bei den gewählten experimentellen Bedingungen etwa 0,12 μM .

Die mittels simultaner, numerischer Lösung beider Gleichungen berechneten Polymerisationskurven sollten durch Variation des K_M -Wertes den experimentell ermittelten Kinetikkurven (Abb. 18) angepaßt werden. Es zeigte sich, daß keine Übereinstimmung der berechneten mit den gemessenen Polymerisationskurven erzielt werden konnte. Aufgrund der erheblichen Abweichung kann das mathematische Modell als nicht zutreffend angesehen werden. Dies bestätigt, daß die Herabsetzung der Elongationsgeschwindigkeit im Vergleich zur Referenzprobe nicht auf die Bildung eines G-Aktin/Peptid-Komplexes zurückzuführen ist. Das 21 kDa-Peptid bindet auch bei Anwesenheit von K^+ -Ionen an die stumpfen Enden der Aktin-filamente und behindert damit die Assoziation von Aktinmonomeren an die Filamentenden.

3.4. Zentrifugationsexperimente

Die bei den Fluoreszenzmessungen ermittelte Aktin-Bindungsaffinität des Capping-Proteins ließ sich auch durch Zentrifugationsexperimente belegen. Für diese Experimente wurden Capping-Protein- und Aktin-Lösung vereinigt und in Gegenwart von 2 mM $MgCl_2$ bei 20 °C inkubiert. Nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes wurde der Capping-Protein/F-Aktin-Komplex durch Zentrifugation von nicht gebundenem Capping-Protein getrennt. Die Konzentration des freien Capping-Proteins im Überstand wurde anhand der Polymerisations-inhibierenden Aktivität des Proteins bestimmt. Die Aktivitätstests zeigten, daß etwa 75 % des Capping-Proteins im Überstand verblieben und 25 % mit Aktinfilamenten cosedimentiert war. Verglichen mit der Konzentration an Aktinfilamentuntereinheiten wurde das Capping-Protein in unterstöchiometrischem Verhältnis eingesetzt (Aktin : Capping-Protein 50:1 - 20:1). Die unvollständige Assoziation mit den Aktinfilamenten weist auf eine relativ schwache Bindungsaffinität hin. Der hohe Gehalt an Capping-Protein im Überstand bestätigt andererseits das Resultat der fluorimetrischen Untersuchungen, daß das Capping-Protein spezifisch an die Filamentenden bindet und nicht an die Filamentuntereinheiten entlang der Aktinfilamente. Für den Fall der Assoziation mit Filamentuntereinheiten sollte bei den gewählten Konzentra-

tionsverhältnissen das Capping-Protein ausschließlich im Sediment zu finden sein.

Die weitere Analyse der Zentrifugationsexperimente erfolgte anhand von SDS-Polyacrylamidgelen. Die Spalte '1' der Abb. 19 zeigt das Ergebnis der elektrophoretischen Untersuchung des Sedimentes. Man findet erwartungsgemäß eine intensive Aktinbande sowie den Anteil der mit Aktin-filamenten cosedimentierten Peptide des hinsichtlich des Molekulargewichtes heterogenen Capping-Proteins. Die Aktin-Bindungsaffinität des 21 kDa-Peptids wird ergänzend zu den Fluoreszenzmessungen durch die Zentrifugationsexperimente bestätigt. In der Spalte '2' ist die Zusammensetzung des Zentrifugationsüberstandes zu sehen. Die Farbintensität ('Coomassie-Blau'-Färbung) dieser Peptidbanden beweist, daß sich der Hauptteil des Capping-Proteins im Überstand befindet. Die Aktinbande wird verursacht durch monomeres Aktin, das aufgrund der Gleichgewichts-Monomerenkonzentration nicht in Filamente eingebaut wurde.

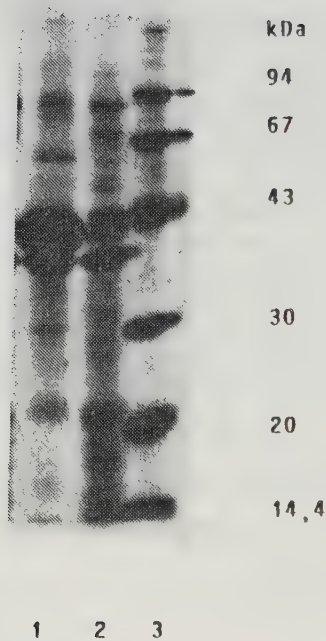


Abb. 19: Analyse der Zentrifugationsexperimente mittels SDS-Gelelektrophorese. (1) Zusammensetzung des Sedimentes, (2) Zusammensetzung des Zentrifugationsüberstandes, (3) Molekulargewichtsmarker. Nach der Zentrifugation wurden die Sedimente im Ausgangsvolumen aufgenommen. Es wurden gleiche Probenvolumina auf das Gel aufgetragen.

4. Diskussion

Der für die Struktur und Dynamik der Zelle wichtige Organisationsgrad der Aktinfilamente wird nicht nur reguliert durch die Fähigkeit des Aktins zur Selbstassoziation, sondern auch durch eine Vielzahl Aktin-bindender Proteine mit unterschiedlichen regulatorischen Eigenschaften. Aus den verschiedensten Zelltypen sind Aktin-bindende Proteine isoliert und charakterisiert worden.

Zu der Gruppe von Aktin-bindenden Proteinen gehört auch das die Aktinpolymerisation beeinflussende Protein, für welches im Rahmen der vorliegenden Dissertation ein Verfahren zur Isolierung aus der glatten Muskulatur von Hühnermägen entwickelt wurde. Die Reinigung des Capping-Proteins erwies sich als sehr schwierig, weil es hinsichtlich des Molekulargewichtes heterogen ist. Aufgrund der Heterogenität wird es mit Vinculin mitgereinigt; deshalb wurde die Aktin-bindende Fähigkeit des Capping-Proteins früher dem Vinculin zugeordnet (81). Die Trennung des Capping-Proteins von Vinculin kann durch Carboxymethyl-Zellulose-Chromatographie bei pH 5,0 erzielt werden (79). Das Capping-Protein reagiert auf diesen pH-Wert mit Aktivitätsverlust und Instabilität, die Polymerisations-inhibierende Aktivität nimmt mit einer Halbwertszeit von einigen Tagen ab. Aus diesem Grunde wird in der vorliegenden Arbeit eine Reinigungsmethode vorgestellt, die

die Carboxymethyl-Zellulose-Chromatographie umgeht.

Zur Reinigung wurden Gelfiltrationssäulen eingesetzt. Dabei stellte sich heraus, daß das Capping-Protein sehr hydrophob ist. Das Protein wurde derart stark an Polyacrylamid- oder Sephadex-Gele adsorbiert, daß eine Rückgewinnung des Proteins nicht möglich war. Als geeignete Säulenmaterialien erwiesen sich dagegen Agarose- und hydrophile Vinylpolymer-Gele. Nach SDS-Gelelektrophorese ist das Molekulargewicht des Capping-Proteins heterogen, im Molekulargewichts-Bereich von 20 kDa bis 80 kDa wurden aktive Peptide gefunden. Da nicht alle hydrophoben Peptide in Gegenwart von SDS dissoziieren (105), bestand die Möglichkeit, daß es sich bei dem Capping-Protein nur um ein Peptid handelt, das aufgrund von Aggregation ein heterogenes Erscheinungsbild hervorruft. Anhand von Harnstoff-haltigen SDS-Polyacrylamidgelen wurde deshalb die Frage geklärt, ob die Heterogenität des Capping-Proteins durch Aggregation verursacht wird. Die Harnstoffgele enthielten Bandenmuster, die mit denen der entsprechenden SDS-Gele ohne Zusatz von 7,6 M Harnstoff übereinstimmten, d.h. Heterogenität als Folge von Aggregation konnte ausgeschlossen werden.

Das 21 kDa-Peptid wurde, wie in dieser Arbeit beschrieben, durch gezielte Fraktionierung von den anderen Peptiden isoliert, identifiziert und charakterisiert. Die Identi-

fizierung der höhermolekularen, dem Capping-Protein zugehörigen Peptide mit Hilfe von immunchemischen Techniken ist Thema einer anderen Dissertation. Im Rahmen dieser anderen Arbeit wurde ein Antiserum gegen das 21 kDa-Peptid präpariert, für die Antikörper-Produktion wurden Kaninchen benutzt. Das Antiserum reagierte mit nahezu allen Peptiden, die in den aktiven Fraktionen (DEAE-Sepharose Cl 6B-Chromatographie) einer Capping-Protein-Präparation vorkamen. Ein Vergleich mit den Zentrifugationsexperimenten ergab, daß die mit Antiserum reagierenden Peptide auch mit polymerem Aktin cosedimentieren. Die Antikörper-Reaktion, also die Komplementarität zwischen der Bindungsstelle der 21 kDa-Peptid-Antikörper und den antigenen Determinanten der anderen Peptide, läßt die Annahme zu, daß die Peptide homologe Aminosäuresequenzen besitzen. Die Heterogenität des Capping-Proteins kommt daher vermutlich durch Proteolyse zustande. Die Peptide sind wahrscheinlich proteolytische Fragmente eines gemeinsamen 'Hauptpeptids'. Nach den vorliegenden Resultaten könnte dieses Peptid eine Molmasse von ungefähr 80 kDa aufweisen, oberhalb von 80 kDa wurde keine meßbare Aktivität gefunden. Die eindeutige Bestimmung erfordert jedoch weitere biochemische Untersuchungen der einzelnen, gereinigten Peptide. Das 21 kDa-Peptid kann als das kleinste, aktive Fragment angesehen werden, da einerseits nur im Molekulargewichts-Bereich zwischen 20 kDa und 80 kDa

Polymerisations-inhibierende Aktivität gefunden wurde und andererseits kein bezüglich des Molekulargewichtes kleineres Peptid mit Aktinfilamenten cosedimentierte.

Wilkins und Lin (106) reinigten vor kurzem das Capping-Protein durch Hydroxylapatit-Chromatographie, auf diese Weise isolierten sie ein Peptidgemisch mit Molmassen zwischen 23 kDa und 33 kDa. Wilkins et al. (107) konnten zeigen, daß gegen dieses Peptidgemisch produzierte Antikörper sowohl an die Adhäsions-plaques in Nicht-Muskel-Zellen als auch an die Z-Scheibe des Muskelsarkomers binden. Es handelt sich also um zelluläre Regionen, an denen eine Verknüpfung zwischen Aktinfilamenten und anderen Zellkomponenten stattfindet. Die biologische Funktion des Capping-Proteins in der lebenden Zelle ist noch unklar. Da das Protein einen sehr hydrophoben Charakter aufweist, verbindet es möglicherweise die Enden von Aktinfilamenten mit anderen Zellbestandteilen.

Der regulatorische Effekt des Capping-Proteins auf die Polymerisation von Aktin wurde 'in vitro' mittels fluorimetrischer Kinetikmessungen untersucht. Die durch 'in vitro'-Experimente erhaltenen Daten sind nicht direkt übertragbar auf die lebende Zelle, da in einer Meßküvette einzelne, in der Zelle ablaufende Vorgänge isoliert vom kompletten System betrachtet werden. Die vorliegenden Resultate geben jedoch Aufschluß über den Mechanismus

der Aktin/Capping-Protein-Interaktion. Das Protein retardierte die Aktinpolymerisation bereits bei deutlich unterstöchiometrischem Konzentrationsverhältnis von Capping-Protein zu Aktinfilamentuntereinheiten (1:50). Diese Tatsache läßt sich damit interpretieren, daß das Capping-Protein spezifisch an die Enden der Aktinfilamente bindet und nicht an die Filamentuntereinheiten entlang der Aktinfilamente. Die ausgeprägte Wirkung des Capping-Proteins - die Elongation der Aktinfilamente konnte nahezu vollständig inhibiert werden - beruht auf der Reaktion mit dem stumpfen, hochdynamischen Filamentende. Das Capping-Protein verhindert dort die Assoziations- und Dissoziationsprozesse von Aktinmonomeren. Ob das Capping-Protein auch an das spitze, langsam wachsende Filamentende bindet, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Die Mehrheit der bisher isolierten Proteine mit Capping-Eigenschaften binden spezifisch entweder an das stumpfe oder spitze Ende. Es existieren aber auch Moleküle (β -Aktinin und Cytochalasin B), welche die Assoziation von Monomeren an beiden Filamentenden verhindern (96, 108).

Bei der Analyse der Bindungsaffinität des Capping-Proteins wurde eine deutliche K^+ -Abhängigkeit festgestellt, während eine Ca^{2+} -Sensitivität nicht beobachtet werden konnte. Die Gleichgewichtskonstante der Capping-Reaktion wurde in Gegenwart von K^+ -Ionen zu $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ und bei Abwesenheit von

K^+ -Ionen zu $35 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ bestimmt. Im Vergleich zu anderen Aktin-bindenden Proteinen ist die ermittelte Bindungsaffinität relativ gering. Ein Ca^{2+} -insensitives Protein aus Rinderhirn weist bei denselben Versuchsbedingungen (100 mM KCl , 2 mM MgCl_2 , 37°C) eine um den Faktor 1000 höhere Bindungsaffinität auf als das Capping-Protein (100). Der von Walsh et al. (109) ermittelte Wert der Gleichgewichtskonstanten für die Bindung von Villin, einem Ca^{2+} -sensitiven Protein, an das stumpfe Aktinfilamentende in Gegenwart von Ca^{2+} beträgt 10^{11} M^{-1} . Die Bindungstendenz des Villins ist demzufolge bedeutend ausgeprägter als die des Capping-Proteins und auch deutlich ausgeprägter als die des Rinderhirn-Proteins. Hochaffin bindet auch der Ca^{2+} -sensitive Gelsolin-Aktin-Komplex aus Human-Thrombozyten an das dynamische Filamentende, die Gleichgewichtskonstante dieser Reaktion wurde von Selve (99) zu $> 10^{11} \text{ M}^{-1}$ bei Anwesenheit von Ca^{2+} bestimmt. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß die Ca^{2+} -sensitiven Proteine eine höhere Aktin-Bindungsaffinität aufweisen als die Ca^{2+} -insensitiven Proteine. Gelsolin und Villin zeigen außer der Capping-Eigenschaft noch andere regulatorische Eigenschaften bei der Interaktion mit Aktin. Die Regulationsreaktionen im biologischen System werden wahrscheinlich durch die jeweiligen Ionenbedingungen gesteuert, eine besondere Rolle nimmt dabei das Ca^{2+} ein. Theoretisch besteht nun die

Möglichkeit, daß in Gegenwart von hohen Ca^{2+} -Konzentrationen ein Ca^{2+} -insensitives, an die Aktinfilamentenden bindendes Protein durch Proteine wie Gelsolin oder Villin 'verdrängt' wird, während in einem Ionenmilieu mit geringer oder nicht vorhandener freier Ca^{2+} -Konzentration das Ca^{2+} -insensitive Protein an die Enden der Filamente binden und somit die Aktinpolymerisation regulieren kann. Möglicherweise wird also die Wechselwirkung zwischen dem Capping-Protein und den Aktinfilamenten in der lebenden Zelle indirekt reguliert durch Konkurrenz mit Ca^{2+} -sensitiven Proteinen, die ebenfalls an die Filamentenden binden.

Das Capping-Protein wirkt nicht als Nukleus für die Aktinpolymerisation. Andere Aktin-bindende Proteine, die Capping- und/oder Fragmentations-Eigenschaften aufweisen (z.B. Gelsolin und Fragmin), besitzen häufig auch Nukleus-Eigenschaften (70-72, 99, 110). Das Verhalten des Capping-Proteins deutet darauf hin, daß eine Bindungstendenz nur gegenüber Aktinfilamenten besteht. Die Nicht-Existenz einer G-Aktin-Affinität wurde auch bei dem Versuch, das Capping-Protein durch Affinitäts-Chromatographie zu reinigen, beobachtet. Das Protein wurde nicht an eine mit monomerem Aktin gesättigte Affinitätssäule adsorbiert. Ein 26 kDa-Protein aus Schweinehirn, das ähnlich wie das Capping-Protein unter physiologischen Bedingungen einen deutlichen Effekt auf die

Polymerisationsgeschwindigkeit des Aktins zeigt, jedoch das Gleichgewicht der Polymerisation nicht beeinflusst, konnte über eine derartige Affinitätssäule isoliert werden (111).

Die Frage, ob die beobachteten Eigenschaften des Capping-Proteins im Hinblick auf die Wechselwirkung mit Aktin direkt übertragbar sind auf die einzelnen Peptide, führte zur Isolierung des 21 kDa-Peptids. Anhand der fluorimetrischen Bindungsstudien konnte gezeigt werden, daß das 21 kDa-Peptid die Aktinpolymerisation auf die gleiche Weise beeinflusst wie das Capping-Protein. Das Peptid bindet ebenfalls spezifisch an die stumpfen Aktinfilamentenden, wobei die Polymerisations-inhibierende Aktivität in K^+ -freiem Medium ausgeprägter ist. Da zur Erreichung des gleichen Effekts auf die Polymerisationsgeschwindigkeit des Aktins jedoch höhere Peptidkonzentrationen im Vergleich zu den Konzentrationen an Capping-Protein erforderlich waren, weist das 21 kDa-Peptid wahrscheinlich eine geringere Bindungsaffinität zu den Filamentenden auf. Möglicherweise besitzen die höhermolekularen Peptide eine zusätzliche Aktin-Bindungsstelle; unterschiedliche Bindungsaffinitäten können aber auch durch strukturelle Unterschiede der einzelnen Peptide bedingt sein. Die Klärung dieses Sachverhaltes wird jedoch erst möglich sein nach der Isolierung der einzelnen höhermolekularen Peptide sowie elektronen-

mikroskopischen Untersuchungen zum Aufbau der Aktinfilament-Peptid-Komplexe.

5. Zusammenfassung

Ein Aktin-bindendes Protein wurde aus Hühnermägen isoliert. Nach SDS/Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist das Molekulargewicht des Proteins heterogen und die Massen der einzelnen Peptide liegen im Bereich von 20 kDa bis 80 kDa. Mit Hilfe einer geeigneten Gelfiltrationssäule (Sephacrose Cl 6B) konnte ein 21 kDa-Peptid durch gezielte Fraktionierung von den anderen Peptiden isoliert werden. Anhand fluorimetrischer Kinetikmessungen wurde der Einfluß sowohl des Proteins als auch des isolierten 21 kDa-Peptids auf die Polymerisation von Aktin untersucht und analysiert. Die Analyse der Fluoreszenzmessungen führte zu analogen Resultaten, das Protein wie auch das 21 kDa-Peptid binden spezifisch an die Aktinfilamentenden und verhindern dort die Assoziations- und Dissoziationsreaktionen von Aktinmonomeren. Der Polymerisations-inhibierende Effekt ist in K^+ -freiem Medium ausgeprägter als bei Anwesenheit von K^+ -Ionen. Ca^{2+} -Sensitivität wurde nicht beobachtet. Die Gleichgewichtskonstante für die Bindung des Proteins an das stumpfe Ende von Aktinfilamenten wurde in Gegenwart von Kaliumionen zu $2 \times 10^6 M^{-1}$ und in Abwesenheit von Kaliumionen zu $35 \times 10^6 M^{-1}$ berechnet. Das Protein wirkt nicht als Nukleus bei der Polymerisation von Aktin und zeigt auch sonst keine Affinität zu G-Aktin.

Die Bindungsaffinität zu den Filamentenden ist relativ gering im Vergleich zu anderen, insbesondere Ca^{2+} -sensitiven Proteinen. Die Ergebnisse der fluorimetrischen Untersuchungen ließen sich durch Zentrifugationsexperimente absichern.

6. Literatur

- 1 Sengbusch, v.P. (1979): "Molekular- und Zellbiologie" (Sengbusch, v. P., ed.), S. 293-324, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- 2 Bray, D. & Thomas, C. (1976) J. Mol. Biol. 105, 527-544
- 3 Pollard, T.D., Aebi, U., Cooper, J.A., Fowler, W.E. & Tseng, P. (1981) CSH Symp. Quant. Biol. 46, 513-524
- 4 Elzinga, M., Collins, J.H., Kuehl, W.M. & Adelstein, R.S. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 70, 2687-2691
- 5 Korn, E.D. (1982) Physiol. Rev. 62, 672-737
- 6 Straub, F.B. & Feuer, G. (1950) Biochim. Biophys. Acta 4, 455-470
- 7 Martonosi, A., Molino, C.M. & Gergely, J. (1964) J. Biol. Chem. 239, 1057-1064
- 8 Elzinga, M., Maron, B.J. & Adelstein, R.S. (1976) Science 191, 94-95
- 9 Vandekerckhove, J. & Weber, K. (1978) Nature (London) 276, 720-721
- 10 Huxley, H.E. (1963) J. Mol. Biol. 7, 281-308

- 11 Huxley, H.E. (1972): "The structure and function of muscles", Vol. I, Kap. VII (Bourne, G.H., ed.), S. 302-387, Academic Press New York, London
- 12 Woodrum, D.T., Rich, S.A. & Pollard, T.D. (1975) J. Cell. Biol. 67, 231-237
- 13 Wegner, A. (1976) J. Mol. Biol. 108, 139-150
- 14 Neuhaus, J.M., Wanger, M., Keiser, T. & Wegner, A. (1983) J. Muscle Res. Cell Mot. 4, 507-527
- 15 Bárány, M., Tucci, A.F. & Conover, T.E. (1966) J. Mol. Biol. 19, 483-502
- 16 Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J.D. (eds.) (1983): "Molecular Biology Of The Cell" S. 553-609, Garland Publishing Inc., New York, London
- 17 Hayashi, T. & Rosenbluth, R. (1962) Biochem. Biophys. Res. Com. 8, 20-23
- 18 Oosawa, F. & Kasai, M. (1971): "Biological Macromolecules Vol. 5: Subunits in Biological Systems" (Timasheff, S.N. & Fasman, G.D., eds.) Part A, S. 261-322, Marcel Dekker, New York
- 19 Adelman, M.R. & Taylor, E.W. (1969) Biocemistry 8, 4976-4987
- 20 Spudich, J.A. (1972) CSH Symp. Quant. Biol. 37, 585-593

- 21 Yang, Y.-Z. & Perdue, J.F. (1972) J. Biol. Chem. 247, 4503-4509
- 22 Hambly, B.D., Barden, J.A., Miki, M. & Remedios d. C.G. (1986) Bio Essays 4, 124-128
- 23 Herman, I.M., Crisona, N.J. & Pollard, T.D. (1981) J. Cell. Biol. 90, 84-91
- 24 Lazarides, E. & Weber, K. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 71, 2268-2272
- 25 Vasiliev, J.M., Gelfand, I.M., Domina, L.V., Ivanova, O.Y., Komm, S.G. & Olshevskaja, L.V. (1970), J. Embryol. Exp. Morphol. 24, 625-640
- 26 Hirokawa, N. & Heuser, J.E. (1981) J. Cell. Biol. 91, 399-409
- 27 Mooseker, M.S. & Tilney, L.G. (1975) J. Cell. Biol. 67, 725-743
- 28 Matsudaira, P.T. & Burgess, D.R. (1982) J. Cell. Biol. 92, 657-664
- 29 Pollack, R., Osborn, M. & Weber, K. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72, 994-998
- 30 Weber, K. & Groeschel-Stewart, U. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 71, 4561-4564
- 31 Tilney, L.G., Hatano, S., Ishikawa, H. & Mooseker, M.S. (1973) J. Cell. Biol. 59, 109-126

- 32 Tilney, L.G., Kiehart, D.P., Sardet, C. & Tilney, M. (1978) J. Cell. Biol. 77, 536-550
- 33 Inoue, S. & Sato, H. (1967) J. Gen. Physiol. 50, 259-292
- 34 Sanger, J.M. & Sanger, J.W. (1980) J. Cell. Biol. 86, 568-575
- 35 Wehland, J., Osborn, M. & Weber, K. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5613-5617
- 36 Taylor, D.L. & Condeelis, J.S. (1979) Int. Rev. Cytol. 56, 57-144
- 37 Kersey, Y.M. & Wessells, N.K. (1976) J. Cell. Biol. 68, 264-275
- 38 Kersey, Y.M., Hepler, P.K., Palevitz, B.A. & Wessells, N.K. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73, 165-267
- 39 Weber, K. & Osborn, M. (1979): "Microtubules" (Roberts, K., Hyams, J.S., eds.) S. 279-313, Academic Press, New York
- 40 Franke, W.W., Schmid, E., Osborn, M. & Weber, K. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, 5034-5038
- 41 Weeds, A.G. (1982) Nature 296, 811-816
- 42 Carlsson, L., Nyström, L.-E., Sundkvist, I., Markey, F. & Lindberg, U. (1977) J. Mol. Biol. 115, 465-483

- 43 Markey, F., Lindberg, U. & Eriksson, L. (1978) FEBS Lett. 88, 75-79
- 44 Harris, H.E. & Weeds, A.G. (1978) FEBS Lett. 90, 84-88
- 45 Blikstad, I., Sundkvist, I. & Eriksson, S. (1980) Eur. J. Biochem. 105, 425-433
- 46 Nishida, E. (1985) Biochemistry 24, 1160-1164
- 47 Lazarides, E. & Lindberg, U. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 71, 4742-4746
- 48 Mannherz, H.G., Goody, R.S., Konrad, M. & Nowak, E. (1980) Eur. J. Biochem. 104, 367-379
- 49 Bretscher, A. Weber, K. (1980) Cell 20, 839-847
- 50 Craig, S.W. & Powell, L.D. (1980) Cell 22, 739-746
- 51 Matsudaira, P., Mandelkow, E., Renner, W., Hestenberg, L.K. & Weber, K. (1983) Nature (London) 301, 209-214
- 52 Northrop, J., Weber, A., Mooseker, M.S., Franzini-Armstrong, C., Bishop, M.F., Dubyak, G.R., Tucker, M. & Walsh, T.P. (1986) J. Biol. Chem. 261, 9274-9281
- 53 Podlubnaya, Z.A., Tskhovrebova, L.A., Zaalishvili, M.M. & Stefanenko, G.A. (1975) J. Mol. Biol. 92, 357-359

- 54 Lazarides, E. & Burridge, K. (1975) Cell 6,
289-298
- 55 Masaki, T., Endo, M. & Ebashi, S. (1967) J. Bio-
chem. (Tokyo) 62, 630-632
- 56 Wang, K. (1977) Biochemistry 16, 1857-1865
- 57 Meigs, J.B. & Wang, Y.-L. (1986) J. Cell. Biol.
102, 1430-1438
- 58 Jokusch, B.M., Burger, M.M., Da Prada, M., Richards,
J.G., Chaponnier, C. & Gabbiani, G. (1977) Nature
(London) 270, 628-629
- 59 Jokusch, B.M. & Isenberg, G. (1981) Proc. Natl.
Acad. Sci. (USA) 78, 3005-3009
- 60 Wegner, A. (1982) J. Mol. Biol. 161, 217-227
- 61 Bailey, K. (1946) Nature 157, 368-369
- 62 Cohen, I. & Cohen, C. (1972) J. Mol. Biol. 68,
383-387
- 63 Fine, R.E., Blitz, A.L., Hitchcock, S.E. & Kaminer,
B. (1973) Nat. New. Biol. 245, 182-186
- 64 Bretscher, A. & Weber, K. (1978) FEBS Lett. 85,
145-148
- 65 Fine, R.E. & Blitz, A.L. (1975) J. Mol. Biol. 95,
447-454

- 66 Kobayashi, R., Tawata, M., Mace, M.L., Bradley, W.A. & Field, J.B. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 702, 220-230
- 67 Lazarides, E. (1975) *J. Cell. Biol.* 65, 549-561
- 68 Lewis, W.G., Cote, G.P., Mak, A.S. & Smillie, L.B. (1983) *FEBS Lett.* 156, 269-273
- 69 Yin, H.L. & Stossel, T.P. (1979) *Nature (London)* 281, 583-586
- 70 Isenberg, G., Aebi, U. & Pollard, T.D. (1980) *Nature (London)* 288, 455-459
- 71 Hasegawa, T., Takahashi, S., Hayashi, H. & Hatano, S. (1980) *Biochemistry* 19, 2677-2683
- 72 Hinssen, H. (1981) *Eur. J. Cell. Biol.* 23, 225-240
- 73 Oosawa, F. & Kasai, M. (1962) *J. Mol. Biol.* 4, 10-21
- 74 Erickson, H.P. & Pantaloni, D. (1981) *Biophys. J.* 34, 293-309
- 75 Wegner, A. & Engel, J. (1975) *Biophys. Chem.* 3, 215-225
- 76 Wegner, A. & Savko, P. (1982) *Biochemistry* 21, 1909-1913
- 77 Cooper, J.A., Buhle, Jr. E.L., Walker, S.B., Tsong, T.Y. & Pollard, T.D. (1983) *Biochemistry* 22, 2193-2202

- 78 Lal, A.A., Korn, E.D. & Brenner, S.L. (1984) J. Biol. Chem. 259, 8794-8800
- 79 Evans, R.R., Robson, R.M. & Stromer, M.H. (1984) J. Biol. Chem. 259, 3916-3924
- 80 Isenberg, G., Leonard, K. & Jockusch, B. (1982) J. Mol. Biol. 158, 231-249
- 81 Wilkins, J.A. & Lin, S. (1982) Cell 28, 83-90
- 82 Szent-Györgyi, A. (1951) Chemistry of Muscular Contraction, 2nd ed., S. 146-151, Acad. Press, New York
- 83 Rees, M.K. & Young, M. (1967) J. Biol. Chem. 242, 4449-4458
- 84 Detmers, P., Weber, A., Elzinga, M. & Stephens, R.E. (1981) J Biol. Chem. 256, 99-105
- 85 Elzinga, M. & Collins, J.H. (1975) J. Biol. Chem. 250, 5897-5905
- 86 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
- 87 Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685
- 88 Shapiro, A.L., Vinuela, E. & Maizel, jr. J.V. (1967) Biochem. Biophys. Res. Com. 28, 815-820
- 89 Weber, K. & Osborn, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412

- 90 Hager, A.D. & Burges, R.R. (1980) Anal. Biochem. 109, 76-78
- 91 Keiser, T. (1985) Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, Fakultät Chemie
- 92 Feramisco, J.R. & Burridge, K. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1194-1199
- 93 Nishida, E., Kuwaki, T., Maekawa, S. & Sakai, H. (1981) J. Biochem. (Tokyo) 89, 1655-1658
- 94 Wegner, A. (1982) Nature 296, 266-267
- 95 Gilbert, H.R. & Frieden, C. (1983) Biochem. Biophys. Res. Com. 111, 404-408
- 96 Pollard, T.D. & Mooseker, M.S. (1981) J. Cell Biol. 88, 654-659
- 97 Bonder, E.M., Fishkind, D.J. & Mooseker, M.S. (1983) Cell 34, 491-501
- 98 Grazi, E. (1984) Biochem. J. 223, 571-576
- 99 Selve, N. (1986) Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, Fakultät Biologie
- 100 Wanger, M. & Wegner, A. (1985) Biochemistry 24, 1035-1040
- 101 Wegner, A. (1982) J. Mol. Biol. 161, 607-615
- 102 Kondo, H. & Ishiwata, S. (1976) J. Biochem. (Tokyo) 79, 159-171

- 103 Tilney, L.G., Bonder, E.M., Coluccio, L.M. & Mooseker, M.S. (1983) J. Cell Biol. 97, 112-124
- 104 Wegner, A. & Isenberg, G. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 80, 4922-4925
- 105 Nozaki, Y., Reynolds, J.A. & Tanford, C. (1978) Biochemistry 17, 1239-1246
- 106 Wilkins, J.A. & Lin, S. (1986) J. Cell Biol. 102, 1085-1092
- 107 Wilkins, J.A., Risinger, M.A. & Lin, S. (1986) J. Cell Biol. 103, 1483-1494
- 108 Yokota, E. & Maruyama, M.S. (1983) J. Biochem. (Tokyo) 94, 1897-1900
- 109 Walsh, T.P., Weber, A., Higgins, J., Bonder, E.M. & Mooseker, M.S. (1984) Biochemistry 23, 2613-2621
- 110 Tellam, R. & Frieden, C. (1982) Biochemistry 21, 3207-3214
- 111 Maekawa, S., Nishida, E., Ohta, Y. & Sakai, H. (1984) J. Biochem. (Tokyo) 95, 377-385

Lebenslauf

Persönliche Angaben

geboren am	29.9.1956	in Witten
Eltern		Joachim Arnold, Erika Arnold
Familienstand	seit 23.9. 1977	verheiratet
	19.8. 1980	Geburt eines Sohnes

Schulbildung

1963-67	Volksschule in Witten
1967-73	Adolf-Reichwein-Real- schule in Witten
1973-76	Städtisches Schiller- Gymnasium in Witten, Abschluß: Abitur

Studium

Okt. 1976	Immatrikulation an der Ruhr-Universität Bochum
Okt. 1976 - Juni 1980, Juli 1982 - April 1984	Studium der Chemie mit dem Abschluß: Diplom (Unterbrechung des Studiums wegen Geburt und Erziehung des Kindes)
Juni 1984 - Dez. 1987	Anfertigung einer Disser- tation am Lehrstuhl für Physiologische Chemie I, SFB-Projekt

